

Universidade de São Paulo  
Instituto de Biociências  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral – IB-USP

Amanda Santos Pardiniho

Controle da resposta inflamatória do tecido  
adiposo por melatonina: papel da citocina IL-4

Control of the inflammatory response of adipose  
tissue by melatonin: role of the cytokine IL-4

São Paulo

2023

Amanda Santos Pardiniho

Controle da resposta inflamatória do tecido  
adiposo por melatonina: papel da citocina IL-4

Control of the inflammatory response of adipose  
tissue by melatonin: role of the cytokine IL-4

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção de Título de  
Mestra em Ciências, na Área de  
Fisiologia Geral.

Orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Regina P.  
Markus

Co-orientador: Dr. Sanseray da Silveira  
Cruz-Machado

São Paulo

2023

# Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:  
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Santos Pardino, Amanda  
Controle da resposta inflamatória do tecido adiposo por melatonina : papel da citocina IL-4 / Santos Pardino Amanda ; orientadora P. Markus Regina ; coorientador da Silveira Cruz-Machado Sanseray -- São Paulo, 2023.  
71 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Fisiologia).

1. Melatonina. 2. Tecido Adiposo. 3. Dieta rica em lipídeos. 4. citocina IL-4. I. P. Markus, Regina, orient. II. da Silveira Cruz-Machado, Sanseray, coorient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:

Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra. Regina P. Markus  
Orientadora

*Às minhas eternas companheiras, Meg e Mel*

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde, sabedoria e proteção para seguir sempre em frente, apesar das adversidades.

Aos meus pais, Eval e Honorina, que sempre tiveram muita paciência comigo, me incentivaram e permitiram que esse mestrado se tornasse possível. Amo vocês!

Agradeço ao meu amor, Felipe Simão, por toda ajuda e companheirismo ao longo desses 10 anos. Por sempre ouvir meus anseios e por me dar forças nos momentos difíceis, possibilitando que os últimos anos se tornassem mais leves.

Aos meus irmãos e sobrinhos, Alex, Andreia, João Vitor, Júlia e Theo, pelo carinho e por estarem torcendo pelas minhas conquistas.

Aos meus amigos, Suraia, Felipe e Edivaldo por todas as conversas, risadas e angústias compartilhadas.

À minha orientadora, professora Regina, por tornar este mestrado possível. Agradeço a sua generosidade por compartilhar seu vasto conhecimento sobre a ciência e a vida, o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa. Foi uma honra trabalhar com você.

Agradeço ao Sanseray, meu co-orientador, por me ajudar na bancada do laboratório e por compartilhar seu conhecimento para a realização desta pesquisa.

Aos professores Pedro Fernandes e Zulma Ferreira pelas conversas e grandes ensinamentos.

Agradeço à Débora Moura, uma querida amiga que o DarkLab me presenteou. Agradeço pelas nossas conversas, almoços, caronas e conselhos.

A todos os colegas do DarkLab por toda ajuda, aprendizados e conhecimentos compartilhados. Pelos momentos de distração e conversas.

Aos funcionários do Instituto de Biociências da USP, principalmente a Renata que muitas vezes me ajudou com os experimentos realizados no biotério. Agradeço ao Manoel pelas conversas e à Roseli por estar sempre disposta a me ajudar a resolver os problemas da melhor maneira.

Agradeço, por fim, o apoio financeiro das agências de fomento CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (n.º do processo 157595/2019-6) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com o código de financiamento 001.

# ÍNDICE

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                | <b>8</b>  |
| 1.1. GANHO DE PESO                                                                  | 9         |
| 1.2. TECIDO ADIPOSEO                                                                | 10        |
| 1.3. DISFUNÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO                                            | 12        |
| 1.4. IL-4 NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO                                                 | 13        |
| 1.5. MELATONINA- EIXO IMUNE-PINEAL                                                  | 14        |
| 1.6. OBESIDADE E MELATONINA                                                         | 18        |
| 1.7. NOVOS RUMOS                                                                    | 19        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                 | <b>19</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                        | <b>21</b> |
| 3.1. ANIMAIS                                                                        | 22        |
| 3.2. DROGAS E REAGENTES                                                             | 22        |
| 3.3. Preparo dos fármacos                                                           | 23        |
| 3.4. Indução de ganho de peso por dieta rica em lipídeos                            | 23        |
| 3.5. Separação da fração estromal dos adipócitos                                    | 24        |
| 3.6. Marcação Celular por Agentes Fluorescentes para Citometria de Fluxo por Imagem | 24        |
| 3.7. Cálculo da área dos adipócitos                                                 | 25        |
| 3.8. Análise Estatística                                                            | 25        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                | <b>26</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                                                                 | <b>38</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>                                                                 | <b>45</b> |
| <b>7. RESUMO</b>                                                                    | <b>46</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                | <b>48</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. GANHO DE PESO

Peso corporal é uma temática prevalente na civilização ocidental e está ligada a padrões de estética, bem-estar e doenças como a obesidade. Os unitermos "ganho de peso" e "obesidade" quando buscados no Google Scholar e no PubMed retornam uma proporção oposta resultados. No Google Scholar, em agosto de 2023, foram aproximadamente 6,5 milhões de entradas para "ganho de peso" e 3,5 milhões para "obesidade". No PubMed foram 104.042 (ganho de peso) e 456.681 (obesidade). Considerando que o PubMed é um motor de busca voltado para a área biomédica fica evidente que a patologia está privilegiada em relação à fisiologia. Mais recentemente tem-se buscado entender os processos de ganho de peso fisiológicos resultado de uma ingesta rica em calorias. Também neste tópico a avaliação de sobrepeso resultante de um longo período de ingesta também é privilegiada em relação a efeitos resultantes de um curto período.

No processo de injúria, ocasionado por um balanço energético positivo, ocorre remodelação do tecido adiposo, alterações da matriz extracelular e indução de fenótipo pró-inflamatório em macrófagos residentes, que potencializa o estresse gerado no tecido adiposo (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ et al., 2014). A desregulação metabólica favorece processos fisiopatológicos que resultam em síndromes metabólicas, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) diabetes do tipo II ou dislipidemia, bem como resistência à insulina e à leptina (revisto por WILLIAMS, 2012; CNOP et al., 2012; MISRA et al., 2003).

O tecido adiposo é singular ao responder a agentes pró-inflamatórios. Estudos avaliando dietas ricas em lipídeos administradas por longos períodos mascararam as reações agudas e os processos de compensação. Neste projeto visamos avaliar mudanças na atividade melatonérgica observada nos primeiros sete dias de dieta rica em lipídeos. Entender como é a dinâmica de processos fisiológicos e fisiopatológicos que visam equilíbrios entre demanda e gastos é um foco importante para entender como se dá a dinâmica da manutenção da saúde e da vida.

## 1.2. TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é formado por pré-adipócitos, adipócitos, fibroblastos, células do estroma, células imunológicas, sistema de irrigação e inervação. As células de diferentes origens e perfis estão integradas por uma matriz extracelular própria (IBRAHIM, 2010). Os adipócitos têm como função regular o metabolismo energético via controle do armazenamento e disponibilização de lipídeos sob demanda de atividade cerebral, hepática, pancreática e muscular (BRESTOFF e ARTIS, 2015). Além da regulação da atividade metabólica, produzindo calor a baixas temperaturas. Como esta produção é independente da musculatura, não inclui tremores. Para exercer estas duas atividades os adipócitos apresentam três subtipos: brancos, bege e marrom e são conhecidos dois tipos de tecido adiposo: branco e marrom (NISHIO et al., 2020).

Os adipócitos marrons apresentam diversas gotas (multiloculares) em proporção crescente. São altamente vascularizados e sua tonalidade marrom é resultante da grande quantidade de mitocôndrias. Essas organelas expressam uma família de proteínas, citocromo, de coloração acastanhada. Os adipócitos marrons têm como finalidade gerar calor, aumentando o gasto energético e consequentemente regular o peso corporal, utilizando a conversão de energia química em calor através da proteína de desacoplamento (UCP1) (CANNON E NEDERGAARD, 2004).

Os adipócitos beges podem ser multiloculares, também apresentam uma grande quantidade de UCP1 e atividades semelhantes aos adipócitos marrons. No entanto, é sabido que as células pluripotentes que originam os adipócitos marrons são diferentes das que originam os beges. Pois, adipócitos brancos e beges são provenientes da mesma célula progenitora. A origem dos adipócitos beges também por meio da diferenciação de adipócitos brancos maduros. O que determina essas diferenciações são os estímulos, podendo ser químicos ou ambientais (KAJIMURA et al., 2009; BARBATELLI et al., 2010).

O tecido adiposo branco armazena triglicérides, regula o metabolismo, protege contra choques mecânicos e atua como um isolante térmico. Os adipócitos brancos apresentam uma única gota de gordura, e um núcleo lateralizado sendo, portanto, uniloculares (PFEIFER E HOFFMANN, 2015). Respondem a estímulos hormonais que induzem a lipólise e liberação de ácidos graxos livres na circulação para serem

oxidados ou armazenados em outros tipos de células e tecidos (ARNER et al., 2011).

Em humanos, o tecido adiposo branco está localizado principalmente nas regiões subcutâneas abdominal, glúteo e femoral, e em modelo murino nas regiões, supragenital e mesentérica (IBRAIM, 2010). O tecido adiposo branco, em condições fisiológicas, coordena o metabolismo de diferentes tecidos de forma específica e sob demanda. Este tecido, além de adipócitos brancos e megacariócitos possui uma série de células imunológicas que têm ações fisiológicas funcionais que permitem adaptação à temperatura externa, regulação da ingestão/ metabolismo e a entrega correta nos tecidos em ação (HENRY et al., 2018). No fenótipo magro, adipócitos e células endoteliais produzem constitutivamente interleucina (IL) -33 que atuando sobre células linfóides que liberam citocinas IL-5 e IL-13 mantém a atividade de eosinófilos e macrófagos ativados em um fenótipo alternativo. Estes macrófagos com fenótipo alternativo são característicos do tecido adiposo branco, e são mantidos pela liberação de IL-4 dos eosinófilos. As interações destas moléculas sinalizadoras que atuam em determinadas horas do dia, ou sob demanda alimentar de forma aguda, são importantes para manter o balanço metabólico ao longo das 24 horas. Neste contexto, IL-4 liberada por eosinófilos é necessária para manter as respostas de macrófagos alternativamente ativados. Estes armazenam ferro de forma muito eficiente, reduzindo a disponibilidade do cátion de ferro nos adipócitos e prevenindo a peroxidação lipídica que promoveria danos oxidativos às proteínas, disfunção mitocondrial e baixa sensibilidade à insulina (ORR et al., 2013).

Estes macrófagos com fenótipo alternativo característicos do tecido adiposo produzem noradrenalina, que estimulando adrenoceptores beta 3 localizados nos adipócitos promovem a quebra do triacilglicerol, aumentando a quantidade de mitocôndria e a expressão de UCP1. Também foi visto que esses macrófagos participam da ativação de adipócitos marrons (LIU et al., 2014; NGUYEN et al., 2011).

Há, também, o relato de recrutamento de linfócitos T "killer" e regulatórios. O tema é de grande complexidade e os trabalhos publicados nos últimos 10 anos tornam evidente que há necessidade de se conhecer a fisiologia do tecido adiposo branco antes de entrar em importantes aventuras farmacêuticas ou de nutracêuticas para compensar ganho de peso. (BRESTOFF e ARTIS, 2015).

Em condições de temperatura basal, o tecido adiposo branco de

camundongos alimentados com dietas ricas em lipídeos apresenta o aumento dos adipócitos em tamanho e quantidade, que acarreta no recrutamento de células do sistema imunológico, favorecendo o aumento deste tecido e o ganho de peso (GOOSSENS et al., 2017). Neste trabalho, utilizamos o tecido adiposo branco, mais especificamente o tecido adiposo epididimário para avaliarmos os efeitos da HFD e da melatonina. Este tecido é de fácil localização e permite uma avaliação da variação ponderal de forma individual.

### 1.3. DISFUNÇÃO DO TECIDO ADIPOSE BRANCO

O ganho de peso após refeições ricas em lipídeos é função de um desequilíbrio entre a ingesta de alimentos e o gasto energético. O consumo excessivo de alimentos ricos em gordura resulta em um balanço energético positivo armazenamento do excesso de lipídeos no tecido adiposo branco (PIAGGI et al., 2013; LEBLANC et al., 2018). A alta plasticidade do tecido adiposo branco pode resultar em alterações fenotípicas, incluindo aumento de volume (hipertrofia) dos adipócitos ou em hiperplasia, isto é, aumento do número de células (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ et al., 2014). Há uma interessante discussão sobre os mecanismos envolvidos na hiperplasia. Até duas décadas era voz corrente que o aumento da gotícula de gordura seria um estímulo positivo para a divisão celular. Atualmente, já é aceito que há um estímulo da proliferação de pré-adipócitos localizados no mesmo tecido (CHOE et al., 2016). A dieta rica em lipídeos também induz angiogênese, aumentando a comunicação via hormônios e citocinas do tecido adiposo para os demais tecidos e vice-versa (CREWE et al., 2017). A hipertrofia do tecido adiposo branco prejudica a difusão de oxigênio. A hipóxia induz a produção de moléculas estressoras, dano tecidual, aumento de fibrose e morte celular (SEGERTROM et al., 2007; BJORNTROP et al., 2001).

Além de ser o principal reservatório energético, o tecido adiposo branco atua como um órgão endócrino, tendo a capacidade de interagir com outros sistemas e órgãos por meio da síntese de adipocinas como leptina, adiponectina, adpsina, TNF entre outros, e pode controlar a saciedade, imunidade, gasto energético e a pressão arterial (COELHO et al., 2013; FONSECA-ALANIZ et al., 2006). O aumento do tecido adiposo acarreta numa

alta produção de leptina, essa retroalimentação positiva ocorre para estabelecer uma diminuição no acúmulo de lipídeos, porém, é comum nesses casos ocorrer resistência a leptina, que passa a ser pró-inflamatória induzindo uma resposta tipo 1. Além disso, é relatado o aumento desse hormônio em indivíduos obesos (ALLISON e MYERS, 2014; PARQUE e AHIMA, 2015 ).

O tecido adiposo branco é alvo de hormônios relevantes no controle do balanço energético, como por exemplo, das catecolaminas que exercem ação catabólica (CZECH et al., 2017), a insulina que ativa o anabolismo e a melatonina que passa a reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e o acúmulo de lipídeos (CRUZ-MACHADO, 2017; FARIAS et al., 2019).

#### 1.4. IL-4 NO TECIDO ADIPOSE BRANCO

A citocina IL-4, produzida por células imunológicas e por adipócitos de indivíduos magros, vem sendo descrita como importante mediadora anti-inflamatória no tecido adiposo (ITOH et al.,2011). Além de promover a inibição da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, estimula a lipólise por meio da ação da lipase hormônio-sensível, resultando em uma alta produção de glicerol. Ainda, há estudos que discutem que a IL-4 pode promover o escurecimento do tecido adiposo branco epididimal, bem como, também contribui para inibição da síntese de citocinas inflamatórias por meio do acoplamento ao seu receptor e ativação do eixo "Janus quinase" (Jak) e ativação do "transdutor de sinal e ativador de transcrição 6" (STAT6) (LIN et al., 2020). Em suma, IL-4 é uma citocina chave na manutenção dos macrófagos do tecido adiposo branco em um estado de ativação alternativa.

Desse modo, a falta da IL-4 em animais nocauteados poderia promover um estado pró-inflamatório, resultando na hipertrofia do tecido e, conseqüentemente, no ganho de peso. Do ponto de vista da produção noturna de melatonina pela glândula pineal, haveria a possibilidade de os animais terem redução, ou mesmo a anulação do pico noturno de melatonina, visto que a síntese desta em pinealócitos está diminuída frente a agentes pró-inflamatórios (MARKUS et al., 2018). Este mecanismo já foi verificado em nosso laboratório (CRUZ-MACHADO, comunicação pessoal) que logo na primeira noite em que o animal é submetido a dieta rica em lipídeo ocorre a

ativação do eixo imuno-pineal com uma redução importante da produção noturna de melatonina. Um dos resultados desta ativação é a invasão de leucócitos em tecidos alvo (MARKUS et al., 2018).

O aumento do tecido adiposo em animais ou em humanos em um processo de ganho de peso favorece a migração de macrófagos pró-inflamatórios e a diminuição de mediadores anti-inflamatórios (CASTRO et al., 2017), o que pode acarretar no desenvolvimento de uma inflamação de baixo grau (LEÓN-PEDROZA et al., 2015). A IL-4 regula diretamente o metabolismo de glicose e lipídeos, promovendo tolerância à glicose e a inibição do armazenamento de triacilglicerol (TSAO et al., 2014). Os mecanismos de ação moleculares ou a interação com outros hormônios ainda é pouco descrita.

Deste modo, nosso grupo de estudos tem interesse em avaliar a relação entre IL-4 e melatonina, visto que a melatonina promove síntese de IL-4 por células T em camundongos imunizados com albumina (SHAJI et al., 1998) e induz macrófagos do tecido adiposo com perfil anti-inflamatório (LIU et al., 2018; FARIAS et al., 2019). Assim, sabendo que a melatonina pode regular processos inflamatórios, o intuito deste trabalho é contribuir com a validação da hipótese de que a modulação da melatonina sobre IL-4 pode ser um importante fator para homeostase do tecido adiposo.

## 1.5. MELATONINA- EIXO IMUNE-PINEAL

A identificação e descrição da melatonina foi feita pela primeira vez no ano de 1958 pelo cientista Aaron Lerner e seus colaboradores (LERNER et al., 1958), que observaram que a substância produzida pela pineal modificava os grânulos de pigmento ao redor do núcleo celular de anfíbios. A melatonina não é um hormônio exclusivo do reino animal, ela também é sintetizada por plantas e microorganismos, e por ser encontrada em cianobactérias e na  $\alpha$ -proteobactérias, revela que foi conservada ao longo do curso evolutivo dos seres vivos, tendo como propósito inicial a exclusão de radicais livres, e com as possíveis variações na síntese de melatonina, estabeleceu-se um ritmo e desenvolveu a competência de influenciar o relógio biológico dos seres ao longo da evolução (MANCHESTER et al., 2015; MARGULIS et al., 1975 REITER et al., 2017; ZHAO et al., 2019)

A produção de melatonina ocorre a partir do aminoácido essencial triptofano, que por sua vez, é transformado em serotonina a partir de duas enzimas: a triptofano hidroxilase e a 5-hidroxi-triptofano descarboxilase. Ativação simpática induz a síntese e fosforilação da enzima serotonina N-acetiltransferase (S-NAT) que catalisa a conversão de serotonina em N-acetilserotonina (NAS). A seguir a NAS é metilada pela acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT) para formar melatonina (TAN et al., 2015; FOULKES et al., 1997).

O ritmo circadiano da melatonina pineal é controlado pelo relógio biológico localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ). Esta região possui inervação contínua das células ganglionares que recebem os sinais bioquímicos gerados a partir da luz detectada pelos fotorreceptores melanopsina (GOOLEY et al., 2001), a partir deste estímulo, o NSQ passa a sintetizar ácido gama-aminobutírico (GABA) que, por sua vez, inibe a atividade dos neurônios que se ligam ao núcleo paraventricular (NPV). Deste modo, a sinalização não é transmitida para a glândula pineal e, conseqüentemente, a melatonina não é produzida. Por outro lado, no período escuro o NSQ secreta glutamato, que desempenha um papel crucial na transmissão do impulso até o NPV, seguindo para a pineal, resultando na síntese de melatonina (ACUÑA-CASTROVIEO et al., 2014; RALPH et al.; 1990; MOORE et al., 1995.). Todavia, havendo estímulo luminoso, sua síntese é diminuída, o que torna a melatonina uma substância apropriada para sincronizar as atividades fisiológicas do organismo, informando as variações fotoperiódicas ambientais (GILLETTE et al., 1999).

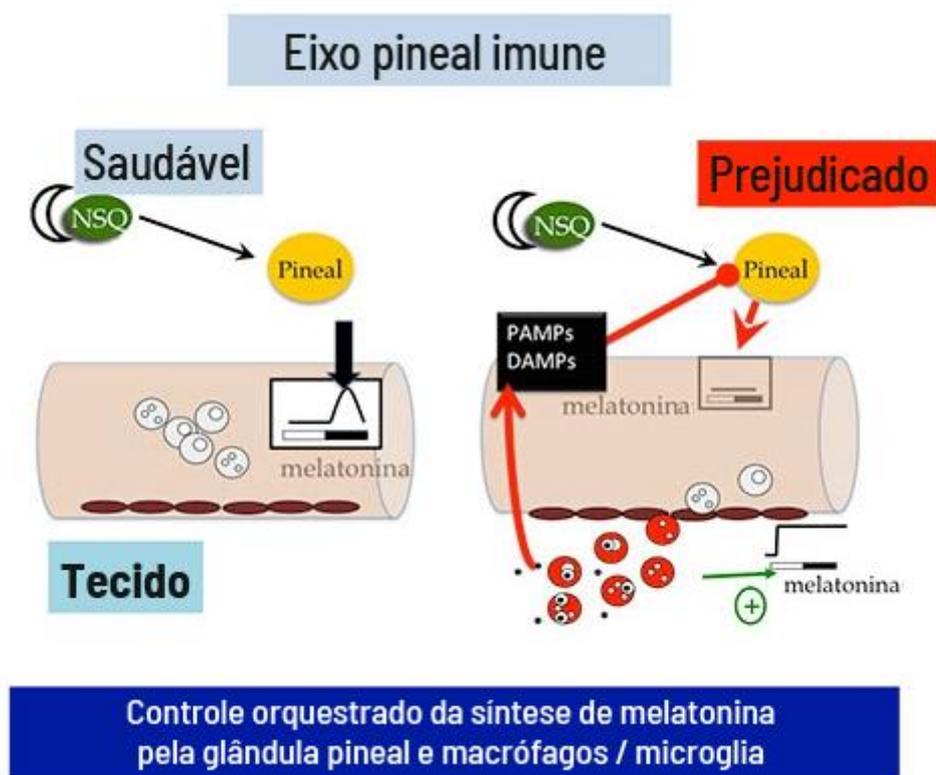
Por ser uma molécula anfipática, devido à sua natureza lipídica, a melatonina atravessa a membrana plasmática. Para refletir o escuro ambiental à noite, a melatonina tem que circular apenas no escuro para voltar aos níveis do claro assim que entra um flash de luz. Para cumprir esta missão, a síntese de melatonina nos pinealócitos é bloqueada por um flash de luz no escuro. Como a melatonina não é armazenada no pinealócito, assim que a síntese é bloqueada não há mais liberação e a mesma sofre efeito de primeira passagem no fígado, sendo metabolizada com eficácia por citocromo oxidases específicas. A melatonina que circula no líquido céfalo-raquidiano também é

metabolizada eficientemente por citocromo oxidases cerebrais (TAN et al., 2015).

A melatonina, além de ser produzida ritmicamente pela glândula pineal, também é sintetizada de forma não rítmica por diversas células no organismo, inclusive por macrófagos e linfócitos ativados para recuperação e reparo (MARKUS et al., 2018). Essa indolamina interage com diferentes moléculas intracelulares, mas a interação de maior eficiência, isto é, que ocorre com menor concentração, é com receptores acoplados à proteína G, denominados de MT1 e MT2 (LIU et al., 2019). Estes receptores estão localizados na membrana plasmática, membrana mitocondrial e em vesículas de internalização (GBAHOU et al., 2017) de diversos tecidos como retina, plexo coróide, órgãos reprodutivos, entre outros (revisto por JOCKERS et al., 2016; CECON et al., 2018).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo durante a década de 90, foi demonstrado que a melatonina sintetizada pela glândula pineal estabelecia controle do ritmo no tamanho do edema na pata de ratos (LOPES et al., 2001). Além disso, outros estudos apontam que a produção rítmica de melatonina pode ser inibida por mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) ou pelo lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana de bactérias gram-negativas (PONTES et al., 2006; MARKUS et al., 2007, 2018; CRUZ-MACHADO et al., 2015). Considerando que a migração de leucócitos para os tecidos é bloqueada pela interação de melatonina com células endoteliais (TAMURA et al., 2010; MARKUS et al., 2013), a supressão noturna de melatonina é essencial para que haja uma montagem eficiente da resposta inflamatória (MARKUS et al., 2013). Ao mesmo tempo, células do sistema imune são capazes de reconhecer esses mesmos mediadores inflamatórios e passam a produzir melatonina de forma independente do fotoperíodo, que por ação autócrina ou parácrina, regulam processos de resolução da inflamação (MARKUS et al., 2007) (Fig.1). Essa alternância na fonte de melatonina durante a montagem e a resolução de uma resposta inflamatória e, posteriormente, a retomada da produção pineal de melatonina mediada por glicocorticóides (FERREIRA et al., 2005, FERNANDES et al., 2009) ou interferon  $\gamma$  (LIMA et al., 2019), é mediada pela translocação nuclear do fator de transcrição  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) que interage com sequências específicas de DNA no promotor do gene da

enzima que converte serotonina em NAS, o precursor direto da melatonina (MUXEL et al., 2010; PIRES-LAPA et al., 2018; LIMA et al., 2019). Deste modo, o término do processo inflamatório e o restabelecimento no ritmo de síntese de melatonina pela glândula pineal seria um fator de relevância para o retorno da homeostase (MARKUS et al., 2018).



**Figura 1 – Eixo imune-pineal:** Em condições normais, a melatonina é produzida pela pineal no período escuro. Por meio de seus receptores, a melatonina inibe a síntese de proteínas de adesão em células endoteliais, bloqueando a migração de leucócitos. Na presença de um estímulo pró-inflamatório, PAMPs<sup>1</sup> e DAMPs<sup>2</sup> são detectados nos pinealócitos fazendo com que a produção de melatonina pela pineal seja bloqueada, o que possibilita a migração de neutrófilos através da camada endotelial. Esses neutrófilos ativam os macrófagos através de citocinas. Para evitar maiores danos aos tecidos, os macrófagos passam a sintetizar melatonina, que induz a fagocitose, processo realizado na fase de resolução. Após esse processo a melatonina pineal volta a ser sintetizada.

**Fonte:** Imagem retirada de Markus (2018).

<sup>1</sup> Padrões moleculares associados à patógenos.

<sup>2</sup> Padrões moleculares associados à danos.

## 1.6. OBESIDADE E MELATONINA

Indivíduos obesos estão em um estado fisiológico de inflamação sistêmica crônica de baixo grau. Nesse tipo de inflamação não ocorre o processo de resolução como acontece na inflamação aguda (CASTRO et al., 2017). A alta quantidade de citocinas inflamatórias acarreta um estresse persistente, prejudicando a produção dos mediadores anti-inflamatórios de modo que os macrófagos não conseguem mudar o seu perfil de inflamatório para anti-inflamatório (ITOH et al., 2011). É interessante destacar que ocorre a diminuição de melatonina produzida na pineal destes indivíduos, o que pode acarretar disfunções cronobiológicas e imunológicas (OSTROWSKA et al., 2001).

Desse modo, muitos estudos vêm relatando a influência da melatonina no ganho de peso e doenças metabólicas, como demonstrado por OTAMAS et al., 2020; TÜMENTEMUR et al., 2020 e IVANOV et al., 2020. Um dos estudos pioneiros foi realizado por Bartness e seu colaborador no ano de 1984, no qual observaram que os hamsters sírios que tiveram a ablação da pineal e foram expostos a fotoperíodo curto, tiveram um aumento do peso corporal (BARTNESS e WADE, 1984).

A melatonina pode exercer uma ação de inibição da armazenagem de gordura visceral nos animais submetidos a uma alimentação rica em lipídeos. Além disso, foi demonstrado que a suplementação de melatonina na água de beber no período de seis semanas, proporciona o escurecimento do tecido adiposo branco inguinal de ratos, além do aumento de proteínas termogênicas UCP1. De modo, que esses fatores auxiliam no aumento do gasto energético e na redução do peso corporal (JIMÉNEZ-ARANDA et al., 2013).

Também há uma ampla discussão em torno do impacto que a exposição à luminosidade constante acarreta nos trabalhadores noturnos. Isso porque, trabalhar durante o período noturno resulta na diminuição da síntese de melatonina, o que impede o processo de oxidação da gordura e faz com que as pessoas tenham uma maior propensão a desenvolver diabetes e obesidade (MIRICK et al., 2013; ANTUNES et al., 2016). Assim como foi determinada uma alta correlação entre risco de diabetes tipo II e mutações no gene que codifica

receptores MT2 (revisto por KARAMITRI et al., 2013; CIPOLLA-NETO et al., 2014). Estudos realizados com adipócitos *in vitro*, demonstraram que a ativação de melatonina via receptor MT2, além de diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, também melhora a expressão e atividade de genes antioxidantes (YANG et al., 2017). Como podemos observar, entre outras funções, a melatonina possui distintas propriedades anti-obesogênica, podendo atuar no tecido adiposo por meio de variáveis mecanismos de ação, regulando a lipólise e o metabolismo energético.

## 1.7. NOVOS RUMOS

A temática da relação entre o tecido adiposo branco e o aumento de peso é bastante complexa. Há interações com as diferentes células que formam o tecido adiposo branco, bem como diferentes sinalizadores intra e extra tecido adiposo. Neste trabalho focamos na possibilidade de avaliar a interação entre melatonina e IL-4 considerando que a melatonina sintetizada a partir da dieta rica em lipídeo seria um elo essencial para o aumento da expressão de IL-4 e, esta citocina faria uma regulação negativa do aumento de peso. Um outro ponto de destaque é que as células imunocompetentes do próprio tecido adiposo e não de outras regiões é que fariam a regulação do ganho de peso.

## 2.OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar se os efeitos antiinflamatórios da melatonina sobre o tecido adiposo são mediados pela IL-4.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- i. Caracterização da influência da HFD sobre o ganho de peso corporal e do tecido adiposo em camundongos selvagens e IL-4;
- ii. Avaliação dos efeitos da HFD sobre o tecido adiposo dos camundongos selvagens, por meio da análise da área dos adipócitos por histologia e citometria de fluxo;
- iii. Determinar o conteúdo de células imunes na fração estromal do tecido adiposo de camundongos selvagens e nocauteados para o gene da IL-4, mantidos em dietas normolipídicas ou ricas em lipídeos;
- iv. Avaliar se melatonina impede o ganho de peso induzido por dieta rica em lipídeos em camundongos C57BL/6 e IL-4 KO.

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados camundongos C57BL/6 com aproximadamente dois meses de idade selvagem e IL-4 nocaute, criados no biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo (IB – USP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno mantidas em sala com ciclo claro/escuro 12/12 horas (luzes acesas 06:00-18:00; luzes apagadas 18:00- 06:00) temperatura e umidade controlada recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados por administração i.p. de xilazina 100 mg/kg e ketamina 40 mg/kg. Esta dose permite fazer a retirada de sangue por punção cardíaca, seguida de perfusão de salina para obtenção de órgãos. Após aproximadamente 10 minutos, quando há perda dos sinais vitais e diminuição da temperatura corporal, são retirados o adiposo epididimário, fígado e cérebro. Todos os procedimentos seguiram as recomendações e os princípios éticos de experimentação animal. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP (CEUA: 000/000)

### 3.2. DROGAS E REAGENTES

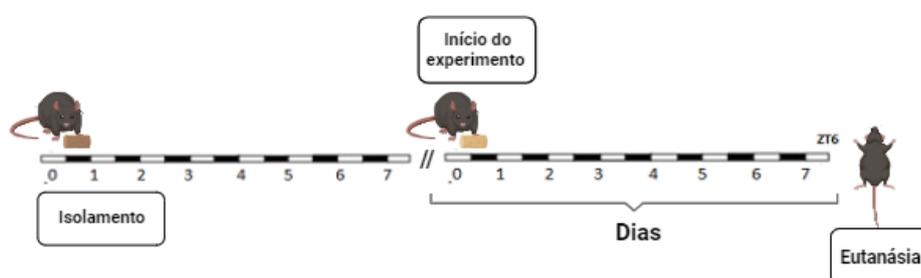
- 1 Abcam (Cambridge, MA, EUA): anticorpo anti-rabbit F4/80; Biolegend (EUA) : anti-rat CD3 FITC, anti-rat CD4 PE, anti-rat CD8a PerCP
- 2 Êxodo Científica (indústria brasileira): Álcool etílico
- 3 Gibco (USA): trypan blue
- 4 Gibco Standard (Gibco standard, Brasil) Soro fetal bovino (BSA)
- 5 Gibco/ Sigma (Canadá): Tripsina
- 6 Sigma- Aldrich ( CA, EUA): albumina; inibidor de tripsina (T6522); melatonina; iodeto de propídeo
- 7 Synth (indústria brasileira): Glicose, NaCl, KHPO<sub>4</sub>, paraformaldeído
- 8 Merck (Brasil) -KCl;
- 9 CRG , (indústria brasileira) NaHCO<sub>3</sub>

### 3.3. PREPARO DOS FÁRMACOS

A solução estoque de melatonina (250 µg/mL, 0,1% etanol) foi estocada a 4°C em garrafas recobertas com papel alumínio. Os demais fármacos e meios foram diluídos em água deionizada purificada por sistema Milli-Q (Millipore®) e armazenados a 4°C

### 3.4. INDUÇÃO DE GANHO DE PESO POR DIETA RICA EM LIPÍDEOS

Considerando que a ingestão de alimentos de animais alojados em uma mesma gaiola não é idêntica para cada animal e que ao serem individualizados alguns ingerem altas quantidades de alimentos no primeiro dia, uma providência prévia ao início do processo experimental foi adaptar os animais em gaiolas isoladas por sete dias. As gaiolas eram de polipropileno e ração básica que será designada como "chow" e água foram fornecidas sem restrição. Ao iniciarmos os experimentos, os grupos controle foram mantidos em ração chow contendo 3,5% calorias provenientes de lipídeos (Nuvilab® - CR-1). Já os grupos experimentais receberam dieta rica em lipídeos (HFD, High-Fat Diet) contendo 42% de calorias proveniente de lipídeos (Rhooster, Araçoiaba da Serra, SP). A ingestão alimentar, hídrica e o peso corpóreo foram avaliados diariamente ao longo de 7 dias. Ao final do protocolo experimental os animais foram eutanasiados (Figura 1).



**Figura 2** - Esquema do protocolo experimental para avaliar os efeitos de 7 dias de alimentação com dieta rica em lipídeos. Os animais foram adaptados a gaiolas individuais por 7 dias e, a seguir divididos em dois grupos CHOW (dieta regular, 3,5% lipídeos); HFD (dieta rica em lipídeos, 42%).

### 3.5. SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO ESTROMAL DOS ADIPÓCITOS

Durante a eutanásia, os animais foram perfundidos transcárdialmente com PBS 1X (aproximadamente 250 ml por animal) para remoção de células imunes circulantes, preservando as células residentes de tecidos. Após a retirada dos tecidos adiposos e sua pesagem em balança de precisão, o tecido foi digerido em solução tampão contendo tripsina, incubado a 37°C por 15 min. Em seguida, foi realizada dispersão mecânica e centrifugação para separação da fração estromal e de adipócitos. Logo após esse processo, fixamos com PFD 0,2%.

### 3.6. MARCAÇÃO CELULAR POR AGENTES FLUORESCENTES PARA CITOMETRIA DE FLUXO POR IMAGEM

As células fixadas no paraformaldeído foram ressuspensas em PBS, e transferidas para um tubo de 1,5 ml e foi centrifugadas (1500 rpm, 5 min), após o sobrenadante descartado, adicionamos PBS contendo BSA (0,5%). Após esse processo as células foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos primários conjugados anti-rat CD3 FITC (1:200), anti-rat CD4 PE (1:200), anti-rat CD8a PerCP (1:200), e com anticorpo primário não conjugado policlonal anti-rabbit F4/80 (1:200). As células foram lavadas 3 vezes, centrifugadas (1500 rpm por 5min) e ressuspensas com PBS. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo secundário goatanti-rabbit PECy7 (1:200) apenas nas amostras que receberam o anticorpo F4/80. As células foram lavadas novamente com PBS contendo BSA(0,5%) foi retirado o sobrenadante e ressuspensado novamente com 1 ml de PBS. As amostras foram analisadas através da citometria de fluxo AMNIS® FlowSight® (Luminex, Austin, TX, EUA) e os dados adquiridos foram analisados com software IDEAS® (Luminex, Austin, TX, EUA).

Após a dispersão mecânica dos adipócitos, estes foram resuspensos em 1 ml de PBS e em seguida foram centrifugadas a 1500

rpm e novamente ressuspensos em 100µl de PBS marcados com 5 µg/ml de Iodeto de propideo. As células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz e então lavadas três vezes com 1 ml de PBS e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

### 3.7. CÁLCULO DA ÁREA DOS ADIPÓCITOS

Os cortes histológicos dos tecidos adiposos epidimários foram feitos pelo setor de técnicas histológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Foram corados com hematoxilina/ eosina e fotografados. A área dos adipócitos foi determinada utilizando o programa Image Processing and Analysis in Java (Image J, NIH).

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Grande parte dos dados estão apresentados como box-plot e whiskers mostrando os percentis 10 e 90% e mediana, foram analisados por ANOVA de uma entrada seguida de pós-teste de Tukey. Os dados obtidos por dois grupos, também estão apresentados por box-plot whiskers mostrando os percentis 10 e 90, esses dados foram analisados pelo teste “t” de Student. As variáveis dependentes estão apresentadas com a média  $\pm$  SD. As médias foram obtidas de pelo menos 3 amostras em cada grupo e foram consideradas significativamente diferentes quando apresentavam probabilidade de  $p < 0,5$ . Todas as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 8.

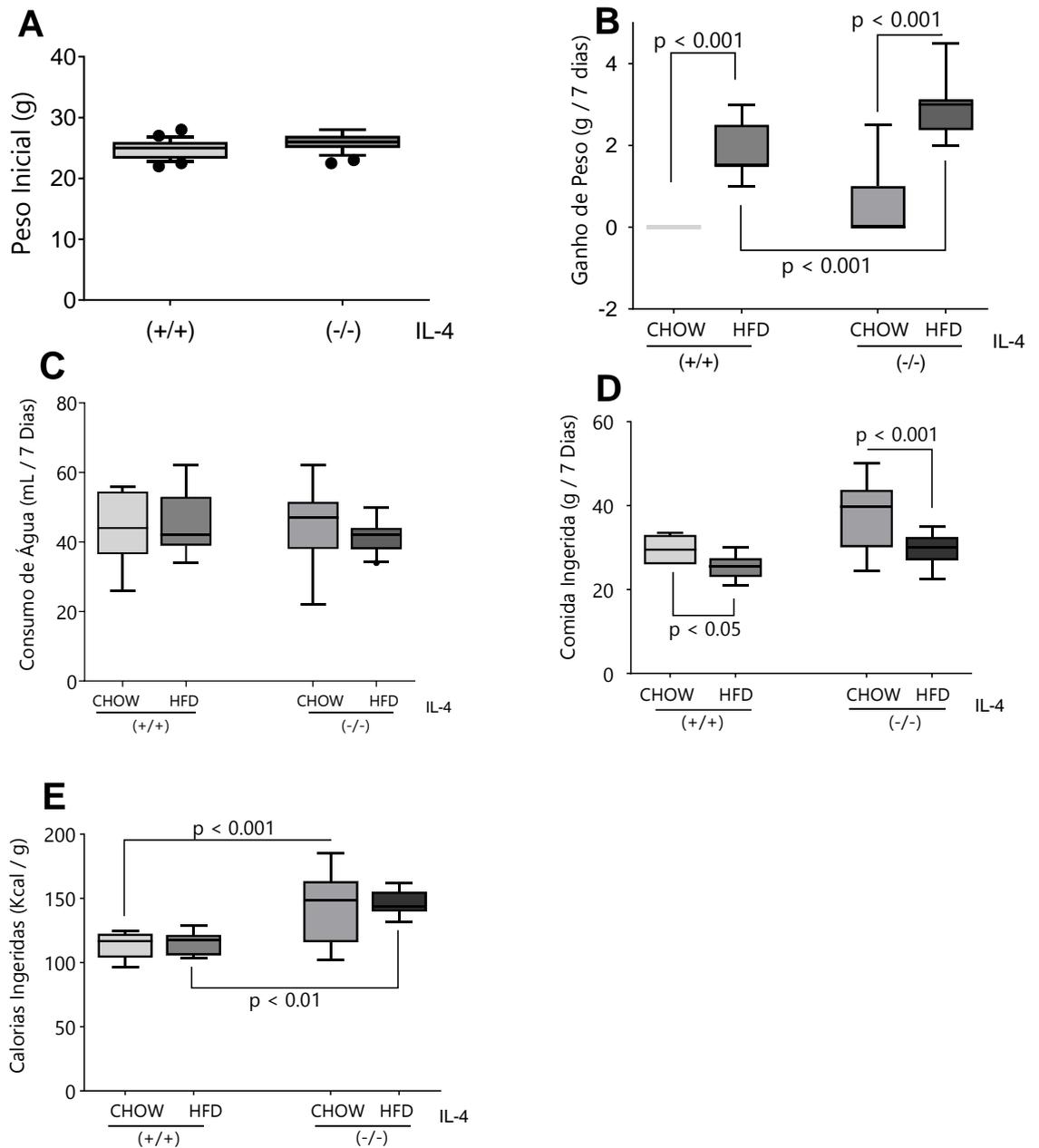
## 4.RESULTADOS

#### 4.1. IL-4 E O GANHO DE PESO EM ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM LIPÍDEOS

Os animais foram mantidos individualmente para registro da ingesta de água, consumo de alimento e peso corporal durante sete dias. O alimento foi oferecido a partir das 17 horas do dia zero até às 12h (ZT6) do dia 7. Os animais selvagens e nocauteados foram separados em dois grupos, controle e experimental, os grupos controle receberam dieta CHOW e os grupos experimentais receberam dieta hiperlipídica (HFD, Rhoster, Araçoiaba da Serra, SP). Os animais foram sacrificados de ZT6 a ZT7 (12 - 13 horas). No dia zero não havia variação significativa de peso entre os grupos experimentais (Fig. 3A).

A HFD provocou um aumento significativo do peso em relação à dieta normolipídica nos dois grupos experimentais (Fig. 3B). Além disso, a dieta HFD acarretou um aumento de peso significativamente maior nos animais nocauteados quando comparados com os selvagens (Fig. 3B). Este aumento não foi à custa da ingestão hídrica (Fig. 3C).

Um achado paradoxal foi que os animais IL-4 KO ingeriram uma quantidade de alimento significativamente menor que o grupo controle (Fig.3D). Este paradoxo pode ser explicado pelo fato de mesmo ingerindo menos alimento houve um aumento da ingesta calórica (Fig. 3E). Este fato já foi observado por outros autores (FOLL et al., 2016) e uma hipótese aceita é que a regulação da saciedade por leptina não estaria modificada nestes animais (FRIEDMAN 2019; ROWLAND et al., 1996).

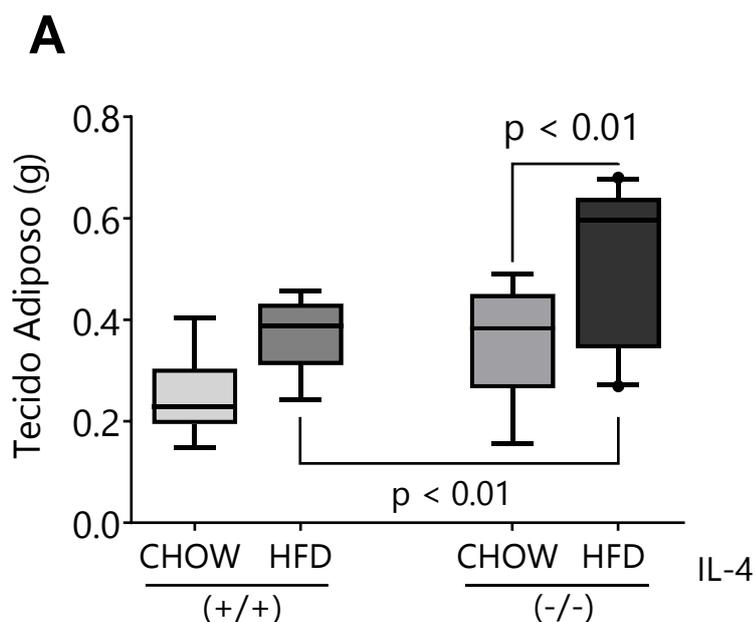


**Figura 3: Efeitos da dieta hiperlipídica (HFD) no ganho de peso, ingestão líquida, alimento sólido e peso do tecido adiposo em camundongos C57BL/6J controle ou IL-4 KO.** Os animais foram alimentados por sete dias com dieta normo e hiperlipídica. **(A)** peso inicial(g) C57BL/6 (n= 24) IL-4KO (n=27); **(B)** ganho de peso (g / 7dias); **(C)** ingestão de água (mL / 7 dias); **(D)** ingestão de ração (g / 7 dias); **(E)** consumo calórico (Kcal/g durante 7 dias); **(F)** peso do tecido adiposo epididimal. Foram utilizados 47 animais, divididos em 4 grupos experimentais: camundongos controle em dieta chow (n=9) ou HFD (n=13) e camundongos IL-4 KO em dieta chow (n=10) e HFD (n=15). Animais que expressam ou não o gene IL-4. Os dados apresentados como box-plot e whiskers mostrando os percentis 10 e 90%, e a mediana foram analisados por ANOVA de uma entrada seguida de pós-teste de Tukey. Os grupos significativamente diferentes estão destacados na figura.

## 4.2. IL-4 REGULA O PESO DO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL

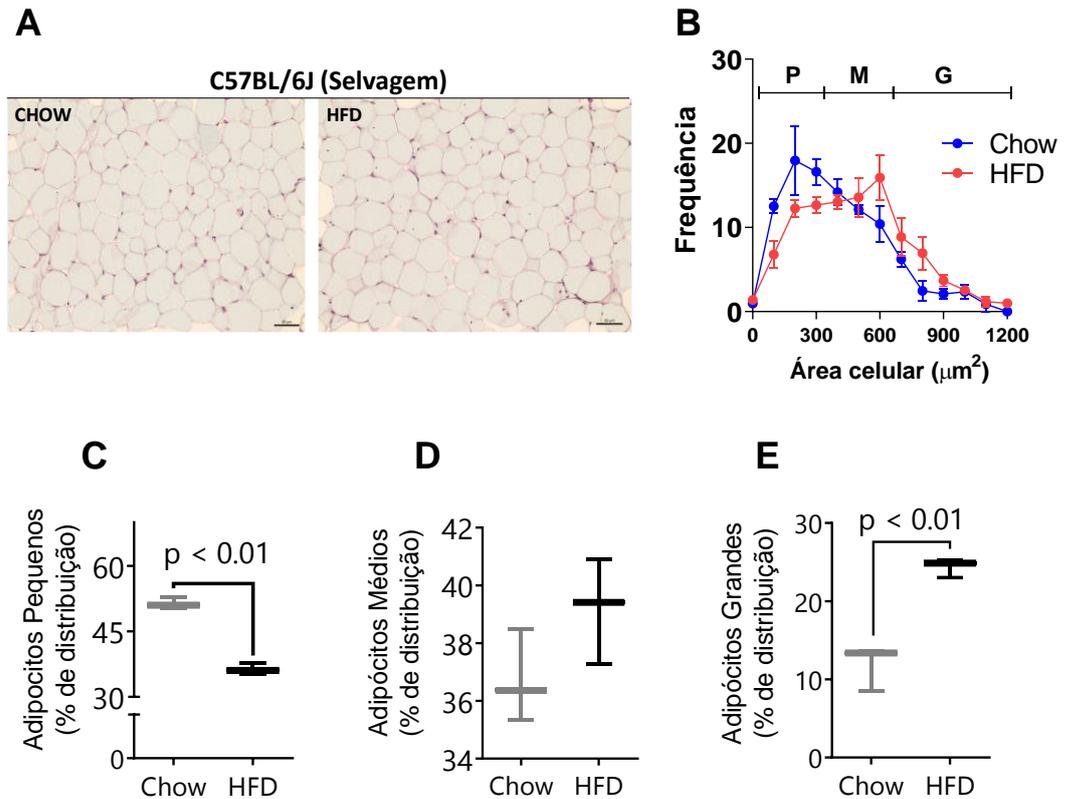
Para avaliarmos os efeitos da dieta hiperlipídica sobre o tecido adiposo branco, removemos e pesamos o tecido adiposo epididimário, este tecido é amplamente utilizado nos estudos sobre obesidade com camundongos machos por ser um tecido responsivo a HFD (SÁRVÁRI et al., 2021).

Em animais controle não houve um aumento significativo no peso do tecido adiposo epididimal após 7 dias de dieta rica em lipídeos. Já no grupo IL-4 KO, HFD induziu um aumento significativo do peso do tecido adiposo epididimal em relação aos selvagens alimentados com HFD e aos IL-4 KO alimentados com dieta chow (Fig. 4A). Chama atenção que nestes grupos experimentais há uma maior dispersão dos valores individuais.

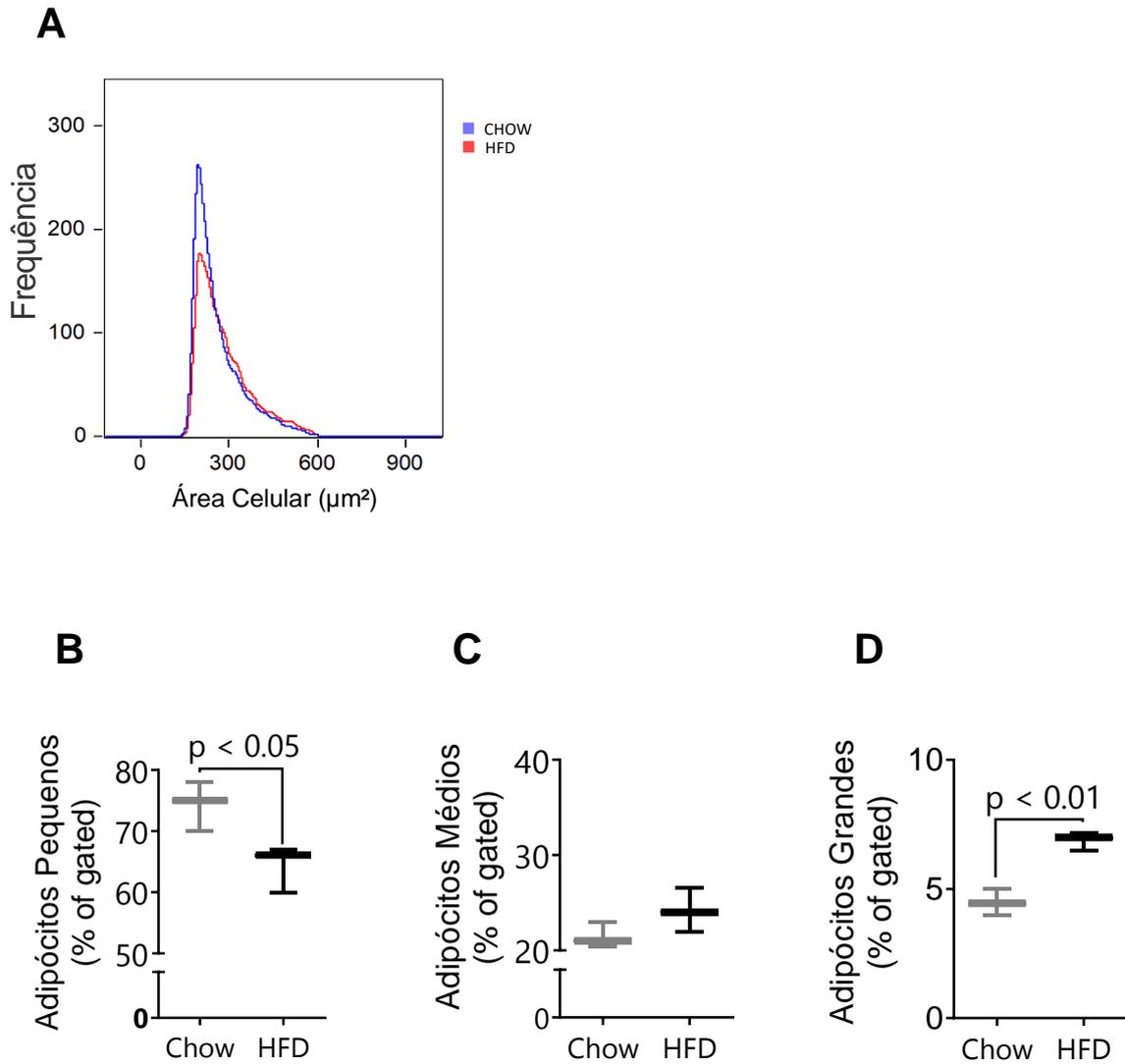


**Figura 4: Efeitos da dieta hiperlipídica (HFD) tecido adiposo epididimal (A) em camundongos selvagens e nocauteados para IL-4.** Os dados estão apresentados como box-plotwhiskers. A linha central representa a mediana e as linhas de dispersão os valores localizados entre 10% - 90% dos dados. Valores considerados outliers estão apresentados como pontos. O número de animais por grupo foi de 8 em controle normolipídico (chow) e IL4KO, bem como controle IL-4KO. No grupo IL4-Ko HFD foram usados 13 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma entrada seguida de pós-teste de Tukey.

Apesar de a HFD não alterar o peso do animal, promoveu alterações histológicas (Fig.5A). Foi detectada uma hiperplasia dos adipócitos ao ser avaliada a distribuição da frequência de área de cada célula (Fig. 5B). A comparação por teste 't' da frequência de células pequenas (Fig. 5C), médias (Fig. 5D) e grandes (Fig. 5E) reforça a hipótese de hiperplasia dos adipócitos. Estes achados foram confirmados com a técnica de citometria de fluxo por imagem (Fig. 6A, 6B). Adipócitos isolados das demais células por ficarem localizados no sobrenadante após centrifugação foram injetados em citômetro de fluxo com imagem. Os núcleos celulares foram corados com iodeto de propídeo e o tamanho celular medido em campo claro. A figura 4A ilustra as células de tamanho pequeno (até 350  $\mu\text{m}$ , 80%), médio (350 - 900  $\mu\text{m}$ , 20%) e grande (acima de 900 $\mu\text{m}$ , 5%). As percentagens apresentadas anteriormente referem-se aos animais alimentados com dieta normolipídica (chow). A HFD diminuiu significativamente a frequência dos adipócitos pequenos (Fig. 6B), não alterando a porcentagem de células médias (Fig. 6C) e aumentando a porcentagem de células grandes (Fig. 6D), sugerindo um acúmulo de gotículas de lipídeo (revisto por WANG et al., 2013). Em suma, apesar da alimentação com HFD não alterar o peso do tecido adiposo epididimal em animais selvagens leva a uma hiperplasia dos adipócitos.



**Figura 5. Comparação de cortes histológicos (hematoxilina/eosina) de tecido adiposo epididimário de camundongos alimentados com dieta normolipídica (CHOW) e hiperlipídica (HFD) por 7 dias. (A) Microscopia óptica de tecido adiposo epididimário corado com hematoxilina eosina. Adipócitos fotografados sob microscópio óptico (ampliação de 100x), barra x micrometros. (B) Distribuição de frequência da área dos adipócitos (C-E) Porcentagem de distribuição de frequência de adipócitos pequenos (C), médios (D) e grandes (E). Dados são apresentados em box-plot whisker mostrando os percentis 10 e 90. Os dados foram analisados pelo teste “t” de Student; n=3 animais por grupo.**



**Figura 6.** Efeitos da dieta hiperlipídica (HFD) na distribuição de adipócitos epididimários de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta normo (chow) ou hiperlipídica (HFD) determinados por citometria de fluxo com imagem. **(A)** Distribuição de frequência da área de adipócitos no tecido adiposo epididimal de camundongos que receberam dieta chow e HFD por 7 dias. **(B)** Células coradas com iodeto de propídeo. **(C-E)** Porcentagem de distribuição de frequência de adipócitos pequenos (C), médios (D) e grandes (E). Boxplot whisker mostrando os percentis 10 e 90. Os dados foram analisados por Test 't de Student'. (n=3) por grupo.

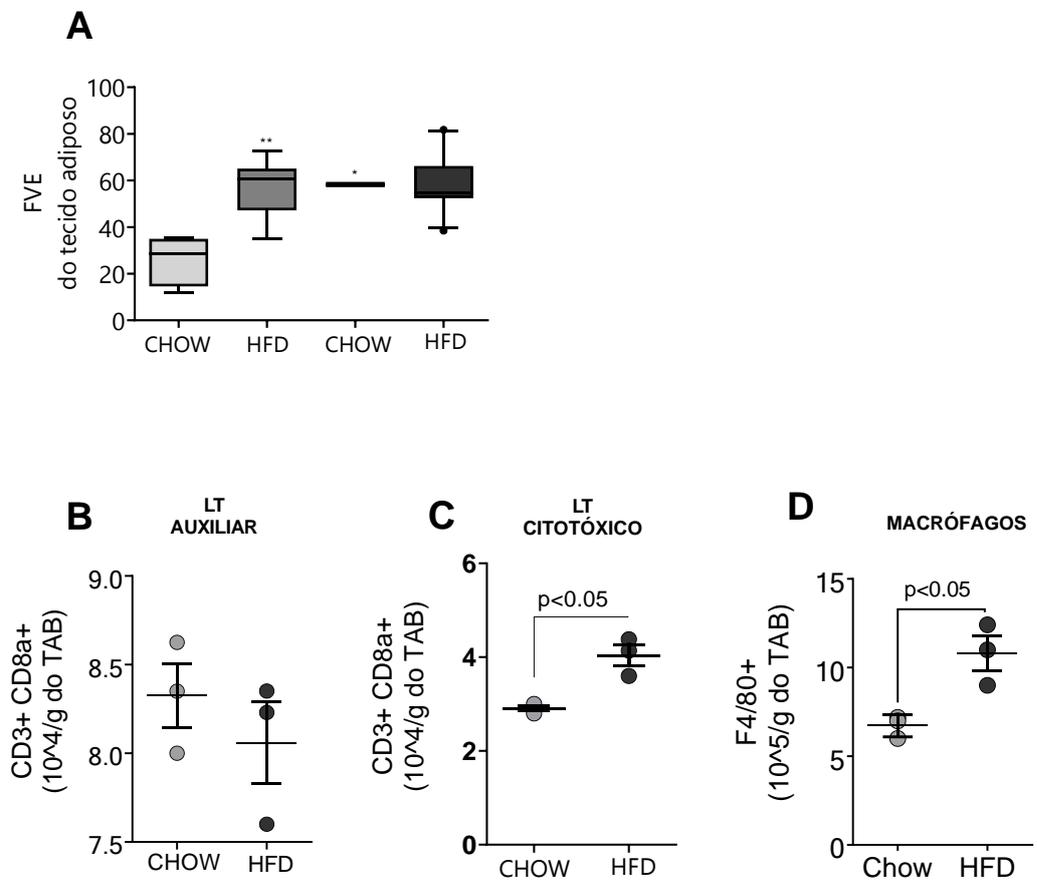
### 4.3. IL-4 PROTEGE TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR HFD

Com o intuito de confirmar que após 7 dias de HFD os animais selvagens teriam montado uma resposta inflamatória aguda sem disparar o sistema imunológico, foi medida a distribuição de linfócitos e macrófagos por citometria de fluxo. O número de linfócitos T auxiliares (*T helper*, CD<sup>3+</sup>/CD<sup>4+</sup>, Fig. 7A) que estariam presentes em uma resposta imunológica desencadeada tardiamente pela inflamação aguda não estava aumentado significativamente. Porém, foi observado um aumento dos linfócitos T citotóxicos (*T killer*, CD<sup>3+</sup>/CD<sup>8a+</sup>) (Fig. 7B) e, também, um aumento significativo da população de macrófagos (F4/80) (Fig. 7C) em células obtidas de camundongos selvagens. Portanto, este é um modelo interessante para avaliar o controle da montagem da resposta inflamatória induzida por HFD.

A hiperplasia do tecido adiposo pode ser ocasionada por uma resposta inflamatória (SCHAFFLER, 2023). Dieta rica em lipídeos estimula receptores do tipo *toll* (TLR) e o estímulo de TLR-4 desencadeia uma resposta inflamatória dependente de NF-κB que induz hipertrofia de adipócitos (ITOH et al., 2011). Interleucina-4 produzida por tecido adiposo epididimário reduz respostas inflamatórias (TSAO et al., 2014). Foi levantada a hipótese que em animais IL-4KO o tecido epididimário estaria em estado pró-inflamatório mesmo na ausência de estímulos. Dessa forma, haveria uma diferença da quantidade e qualidade de células imunocompetentes quando comparadas com os animais selvagens. Também é esperado que a reação a HFD (7 dias) seja alterada.

Em animais selvagens, a porcentagem de células estromais foi significativamente maior em HFD do que em chow. Em animais IL-4 KO não foi observada diferença estatística entre chow e HFD. Ambos os grupos apresentaram um aumento significativo quando comparados com selvagens alimentados com dieta normolipídica (Fig. 7D). Portanto, HFD e nocaute do gene que codifica respostas inflamatórias induziram aumento de células imunocompetentes na fração estromal, sugerindo que IL-4 sintetizado pelo tecido adiposo epididimário teria um efeito redutor na montagem de uma resposta inflamatória. Considerando que a melatonina tecidual ou circulante tem efeito

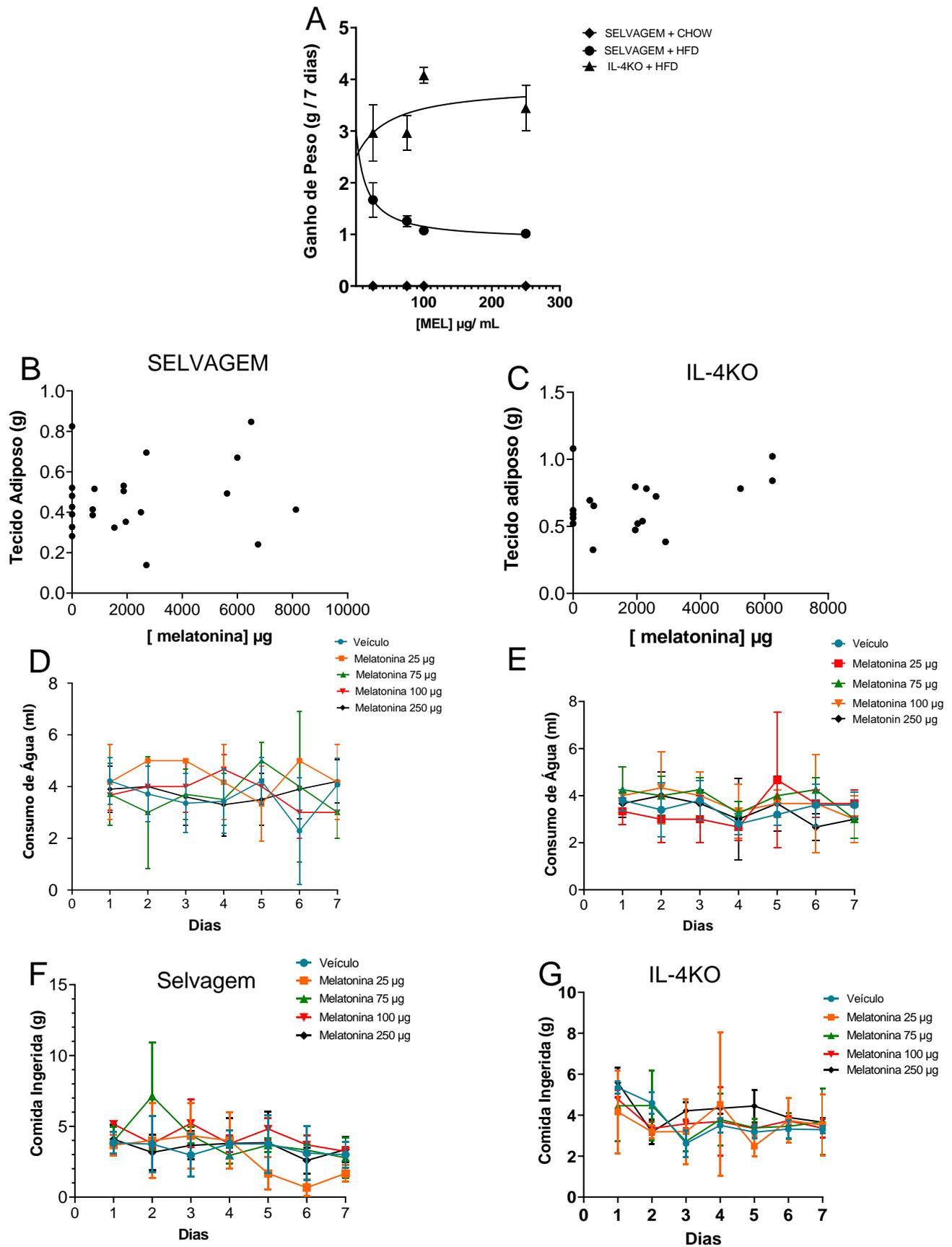
anti-inflamatório por bloquear a migração de células da corrente sanguínea para tecidos (MARKUS et al., 2021) e que IL-4 também exerce esta função em tecido adiposo (TSAO et al., 2014) foi testada a hipótese que melatonina atua via produção de IL-4.



**Figura 7: Efeitos da dieta hiper lipídica na SVCs do tecido adiposo epididimário em camundongos C57BL/6JelL-4KO; efeitos da dieta sobre as células imunocompetentes dos animais C57BL/6J. (A)** Quantificação das células da fração vascular estromal ( $\times 10^5/g$ ) do tecido adiposo de camundongos C57BL/6J controle (N=4), C57BL/6J experimental (n=8), IL-4 KO controle (n=2) e IL-4 KO experimental (n=9). **(B-D)** Número de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> **(B)**; CD3<sup>+</sup> CD8a<sup>+</sup> **(C)**; F4/80<sup>+</sup> **(D)** presentes no tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J. (n=3 por grupo). Boxplot whisker mostrando os percentis 10 e 90. Animais que expressam (+/+) ou não (-/-) o gene IL-4. Os dados foram analisados por ANOVA de uma entrada seguida de pós-teste Tukey\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ; **(B-D)** valores apresentados como média  $\pm$  DP analisados por test "t". Os valores foram considerados significativamente diferentes quando estavam abaixo da probabilidade de 5% de ser obtido por acaso.

#### 4.4. IL-4 MEDEIA EFEITO DE MELATONINA SOBRE DE PESO CORPORAL

Camundongos selvagens e IL-4-KO, alimentados com dieta rica em lipídeos, receberam melatonina (25, 75, 100 ou 250 µg/ml) ou veículo (etanol, 334µg/ml) por via oral. Os animais mantidos em ciclo claro/escuro 12/12 (luz acesa às 7h00) foram pesados durante 7 dias, todos os dias, no início e fim da fase de claro (8h00, 17h30). Todos os animais receberam água durante a fase de claro (6h00 - 18h00) e melatonina ou veículo era introduzido das 5h30-6h00 e retirado das 7h30 - 8h00). O tratamento com melatonina durante sete dias protegeu contra o ganho de peso os camundongos selvagens, mantidos em HFD. Observamos também que a melatonina não reduziu o ganho de peso de animais IL-4KO (Fig 8A), porém, não houve efeito no tecido adiposo epididimal (Fig 8B-8C). O consumo de água (Fig 8D-8E) e alimentar (Fig 8F-8G) dos grupos que receberam melatonina não diferiram dos seus grupos controle.



**Figura 8 - Efeitos do tratamento com melatonina em animais selvagens e IL-4 KO mantidos em dieta hiperlipídica.** Os camundongos selvagens foram separados em cinco grupos: quatro experimentais que receberam, respectivamente, (25 µg/ml) n=3; (75 µg/ml) n=5; (100 µg/ml) n=3 (250 µg/ml) n=5 e um grupo controle que recebeu veículo contendo etanol (334µg/ml) n=7. Os camundongos IL-4 KO também foram separados em grupos: quatro experimentais que receberam, respectivamente, (25 µg/ml) n=3; (75 µg/ml) n=4; (100 µg/ml) n=3 (250 µg/ml) n=3 e um grupo controle que recebeu veículo contendo etanol (334µg/ml) n=5. **(A)** ganho de peso (g / 7 dias). **( B-C)** peso do tecido adiposo epididimal (g) **(D-E)** Ingesta de água + melatonina ou veículo durante o período escuro (ml / 7 dias). **(F-G)** Ingesta de ração (g / 7 dias). Com média ± DP. Os dados foram analisados por ANOVA de uma entrada seguida de pós-teste Tukey. Os dados do gráfico (A) foram ajustados a uma hipérbole regular, apresentando o valor de **r<sup>2</sup> = 0,8639 (selvagem)** e **r<sup>2</sup> = 0,1227 (IL-4 KO)**.

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliarmos se os efeitos anti-inflamatórios da melatonina no tecido adiposo são mediados pela expressão da IL-4. Esta citocina é produzida no tecido adiposo de indivíduos magros e tem como finalidade evitar processos inflamatórios, pois mantém os macrófagos existentes no tecido adiposo com o perfil M2.

A melatonina produzida na pineal é fundamental para incluir informações do ambiente externo cíclico para o ambiente interno, garantindo a manutenção de diversos processos fisiológicos, entre eles, a do balanço energético (SAARELA et al., 1994). Sabe-se que distorções na produção da melatonina noturna gerada pela luz podem ocasionar distúrbios metabólicos como a obesidade, conforme evidenciado em trabalhadores noturnos, pois estes sofrem mudanças constantes do ciclo claro/escuro resultando no aumento da glicose, insulina e pressão arterial. Além disso, também sofrem com a redução da leptina e do sono, fatores que contribuem para o aumento do peso (REITER et al., 2012; KARLSSON et al., 2001)

Devido à sua capacidade de atuar de diversas maneiras e apresentar múltiplos efeitos no sistema biológico, muitos pesquisadores vêm descrevendo seus efeitos positivos na regulação do tecido adiposo, o que faz da melatonina uma molécula alvo no tratamento da obesidade. Vázquez et al., (2018), por exemplo, observaram que o tratamento com melatonina no período de seis semanas promoveu o escurecimento do tecido adiposo branco inguinal e o aumento do peso do tecido adiposo marrom, como também restaurou a expressão da proteína termogênica UCP1 em ratos obesos diabéticos Zucker, o que contribuiu para termogênese e o controle do peso desses animais. A melatonina pode promover a termogênese por meio do receptor MT1, expresso nos neurônios do sistema nervoso central, gerando a síntese de noradrenalina e a expressão gênica de UCP1, PPAR $\gamma$  e PGC1, resultando na termogênese de TAM (TAN et al., 2011).

A melatonina também pode contribuir com a perda de peso por meio de suas propriedades antioxidantes, como visto no estudo realizado com pessoas obesas que foram tratadas com 10mg/ dia de melatonina e com restrição calórica em um período de 30 dias, apresentaram melhora na defesa antioxidante, pois houve uma redução significativa de malondialdeído (MDA), além da redução de peso (SZEWCZYK-GOLEC et al., 2017). Porém, um estudo realizado com a suplementação de melatonina a 3mg/dia durante um período de 30 dias em pessoas que passaram pelo procedimento de remoção da pineal devido a tumores, não identificou variações no peso corporal (HALPERN et al., 2019), como também, não foi identificado uma mudança no peso de ratos mantidos com HFD e tratados com

melatonina durante três semanas (NDUHIRABANDI et al., 2014). A controvérsia desses resultados pode estar relacionada a diversos fatores, como a concentração oferecida e a forma que a melatonina foi administrada.

Nossos dados reforçam a hipótese discutida anteriormente por TAN et al. (2018) e SZEWCZYK-GOLEC et al. (2017), de que a melatonina pode contribuir com a perda de peso. Contudo, diferente do que foi abordado, nossos resultados revelaram que o efeito da melatonina é dependente da IL-4, e pode acarretar na diminuição do peso corporal em um curto período de sete dias, demonstrando que seus efeitos anti-obesogênicos podem ser via regulação do sistema imunológico.

A ingestão de HFD promove liberação de ácidos graxos dos adipócitos, que são acoplados nos receptores TLR-4 presentes nos macrófagos residentes no tecido adiposo, e estes passam a sintetizar TNF desencadeando um processo inflamatório e conseqüentemente o ganho de peso (ITOH et al., 2011). Entre as moléculas que fazem um balanço negativo do aumento de peso do tecido adiposo estão a citocina IL-4, que aumenta a proliferação de macrófagos anti-inflamatórios no tecido adiposo via STAT6 (ZHENG et al., 2015).

Inicialmente, os nossos resultados demonstraram que a falta da IL-4 favoreceu a inflamação no tecido adiposo, pois a administração da HFD, em um curto período de sete dias, promoveu uma potencialização do ganho de peso desses animais. Foi observado, também, um aumento do tecido adiposo mais acentuado em animais nocauteados para IL-4 do que em animais controle, confirmando que a falta da Interleucina-4, juntamente com uma dieta rica em lipídeos, favorece o acúmulo de gordura nesses tecidos e, conseqüentemente, em um maior ganho de peso desses animais, mesmo havendo um menor consumo de HFD. De acordo com FOLL (2019), o consumo excessivo de alimentos ricos em gordura leva a um ciclo vicioso, pois pode desencadear sentimentos compensatórios, resultando no desenvolvimento da obesidade. No entanto, foi relatado que o consumo exacerbado de HFD por ratos resistentes a dieta (DR), promove a síntese de corpos cetônicos nos astrócitos hipotalâmicos, resultando na diminuição do consumo alimentar mesmo ela sendo mais palatável. Sugerindo que esse mecanismo pode servir como uma forma de proteção contra os efeitos adversos da HFD.

A expansão do tecido adiposo visceral está intimamente ligada a fatores de riscos, como doenças metabólicas, cardiovasculares e ganho de peso (MCLAUGHLIN, 2011). Essa expansão ocorre por aumento da circunferência (hipertrofia) e/ou diferenciação de pré adipócitos em adipócitos maduros (hiperplasia). Muitos autores discutem que a ocorrência

destes mecanismos são dependente da localização do tecido, como visto por Marcotela et al.(2012) *in vitro*, e Digirolamo et al. (1998) em ratos Wistar, onde o aumento do tecido adiposo subcutâneo se dá, predominantemente por hiperplasia, e a expansão do tecido adiposo visceral é por hipertrofia. Já em outros estudos, verificaram que a expansão visceral por hiperplasia ocorre após dois meses mantendo os camundongos com a dieta rica em lipídeos (BILAL et al., 2021; WANG et al., 2013).

Em nossas análises com adipócitos obtidos do tecido adiposo epididimal do grupo controle, não foi diferente, pois a HFD promoveu a hipertrofia em um curto período de sete dias, mesmo não havendo diferença no peso do tecido adiposo desses animais. Dados histológicos e por citometria de fluxo com imagem apontaram, ainda, uma menor porcentagem de adipócitos pequenos e uma maior porcentagem de adipócitos grandes, indicando o acúmulo de triacilglicerol nessas células. Deste modo, confirmamos que o evento inicial predominante para o aumento do tecido adiposo branco epididimal se dá por hipertrofia.

A literatura também aponta que durante uma resposta inflamatória do tecido adiposo, macrófagos residentes passam a sintetizar quimiocinas que são capazes de controlar a migração de células imunológicas para o tecido adiposo (revisto por CHAWLA et al., 2011). Vale destacar que este processo de migração é um dos indícios para a montagem de uma resposta inflamatória (revisto por LU et al., 2019). Nesse cenário, nosso estudo demonstrou que a fração vascular estromal do tecido adiposo epididimário de camundongos controle, que receberam HFD, revelou-se alterada, pois houve um aumento na quantidade de células. Porém, nos animais IL-4 KO, o aumento ocorre mesmo em animais que receberam a dieta normo lipídica, o que indica que a falta da IL-4 promove uma alteração no número de células da fração vascular estromal.

A fração vascular estromal do tecido adiposo é composta por diferentes populações de células, como células-tronco mesenquimais, pré-adipócitos, células endoteliais, células T e macrófagos (HAN et al., 2015). E por se tratar de um conteúdo diverso, analisamos de forma mais específica e verificamos que os animais que receberam HFD obtiveram um maior número de linfócitos T supressor/citotóxico. Esse sub grupo de linfócitos induz, por meio da síntese de IFN- $\gamma$ , a apoptose de células infectadas ou disfuncionais (ABBAS et al., 2012). No caso dos adipócitos, eles se estabelecem neste termo, pois o acúmulo de gordura exacerbado, como visto em humanos e roedores obesos, promove a disfunção dos adipócitos, o que resulta na morte celular, sendo este um estímulo para a migração e proliferação de macrófagos inflamatórios para o tecido adiposo (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ et

al., 2014; SCHIPPER et al., 2012).

Nishimura et al. (2009), verificaram que durante o processo de inflamação do tecido adiposo visceral em camundongos mantidos em HFD, as células T citotóxicas presentes no tecido adiposo são capazes de interagir com macrófagos promovendo a sua polarização para M1 e recrutamento. Essa interação também foi observada *in vitro*, onde a co-cultura de células T CD8 com monócitos promoveu a diferenciação em macrófagos e a produção de citocinas (NISHIMURA et al., 2009).

Dessa forma, nossos resultados reforçam o que foi citado na literatura, visto que a HFD acarretou no aumento das células T CD8 no tecido adiposo epididimal após sete dias, apontando para o seu papel fundamental no desencadeamento da inflamação. Como previsto, também observamos um aumento na quantidade de macrófagos presente na fração vascular estromal dos camundongos mantidos com dieta rica em lipídeos. Por se tratar das células imunológicas que estão mais presentes no tecido adiposo visceral, os macrófagos ativados encontram-se intimamente envolvidos na inflamação (LIANG et al., 2022). Conforme os processos inflamatórios avançam, ocorre a necrose dos adipócitos, e os sinais liberados nesse processo recrutam macrófagos derivados de monócitos para o tecido adiposo, que passam a sintetizar TNF. Os macrófagos se reúnem formando sincícios como uma espécie de coroa ao redor dos adipócitos necrosados e passam a captar gotículas de lipídios, sendo essa uma característica recorrente no processo inflamatório crônico (CINTI et al., 2005).

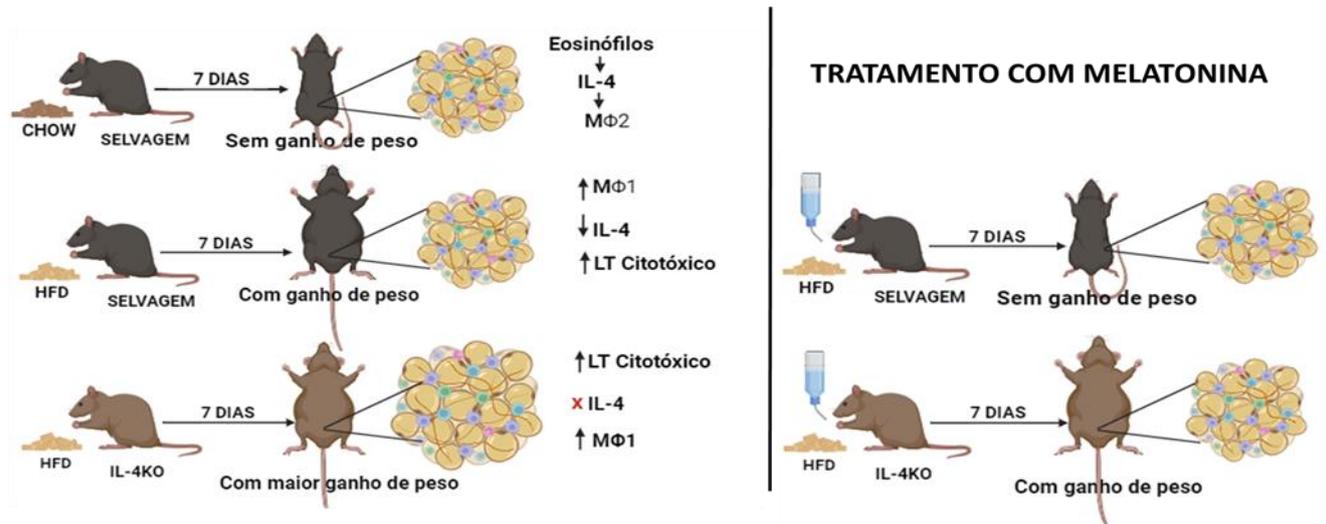
Deste modo, destacamos aqui, que foi possível observar alterações promovidas pela HFD em células fundamentais para montagem da inflamação associada à obesidade, em camundongos selvagens em sete dias. Visto que a HFD está promovendo o ganho de peso em camundongos nocauteados e a inflamação do tecido adiposo em camundongos selvagens em um curto período, passamos a avaliar se uma suplementação de melatonina na água de beber reverteria este processo. Muitos estudos utilizam a suplementação de melatonina como um tratamento para obesidade, pois a melatonina além de ter uma ação cronobiológica, antioxidante e imunológica, pode induzir o escurecimento do tecido adiposo branco em ratos (DE SOUZA et al., 2019) e provocar a lipólise (BORGES-SILVA et al., 2005).

Obtivemos dados interessantes nessa etapa do experimento, onde foi possível observar que a administração de melatonina em torno dos 300µg protege contra os efeitos da HFD, não permitindo um ganho de peso exacerbado. Outros estudos também demonstraram que a suplementação de melatonina impede o ganho de peso em ratos obesos, porém, a administração de melatonina foi realizada em longo prazo (PRUNET-

MARCASSUS et al., 2003; WONDEN-HANSON et al., 2000; RASMUSSEN et al., 1999).

Além disso, também verificamos que para a melatonina ter uma ação protetora contra o ganho de peso é necessário a presença da Interleucina-4, uma vez que os animais nocauteados para IL-4 não obtiveram o mesmo êxito com o tratamento e passaram a ganhar peso independente da concentração de melatonina. Em estudo sobre a atividade conjunta da melatonina com IL-4, descreveram que a melatonina, via IL-4, proporciona a estimulação de colônias de macrófagos, podendo ter propriedades antitumorais. Além disso, também modulam a inflamação nas células endoteliais e epiteliais da retina causada por um alto teor de glicose (XIE et al., 2014; MAESTRONI et al., 1994). Porém, demonstramos pela primeira vez, que a melatonina e IL-4 modulam o ganho de peso de camundongos.

Em vista disso, nossos achados, que estão resumidos na figura 9, além de demonstrarem a importância da melatonina na regulação do peso, sugerem novos ensaios, pois não houve diferença no peso do tecido adiposo. Dessa maneira, novos experimentos poderiam auxiliar a responder alguns questionamentos que emergiram desta pesquisa, como por exemplo, se está havendo diferenciação/migração das células imunológicas ou se estão havendo mudanças estruturais no tecido adiposo, bem como, se a melatonina aumenta a IL-4 nos camundongos selvagens. Inicialmente, a pesquisa contava com ensaios que poderiam auxiliar nessas respostas, porém, por conta de adversidades, como as causadas pela pandemia de COVID-19, por problemas nos equipamentos e perda de material, não foi possível avançar em algumas etapas que complementaríamos nosso trabalho, reiterando os potenciais efeitos da melatonina sobre o ganho de peso.



**Figura 9 - Resumo dos resultados obtidos nos experimentos realizados com camundongos selvagens e nocauteados para IL-4, mantidos em dieta chow ou HFD.** A partir da figura da esquerda de cima para baixo: Camundongos selvagens mantidos em dieta chow no período de sete dias não apresentaram ganho de peso corpóreo e de tecido adiposo epididimal, esses animais apresentam uma maior quantidade de IL-4 sintetizados por eosinófilos mantendo os macrófagos do tecido adiposo branco em um estado alternativo protegendo contra o ganho de peso (BRESTOFF et al., 2015). Na figura abaixo: camundongos selvagens foram alimentados com dieta rica em lipídeos apresentaram ganho de peso corporal, mas não de tecido adiposo. Também observamos um aumento de macrófagos e linfócitos citotóxicos indicando um processo de inflamação, nesse caso, há uma diminuição da IL-4 no tecido adiposo branco (ITOH et al., 2011). No último esquema: observamos que camundongos IL-4KO mantidos em HFD obtiveram um maior ganho de peso corporal e de tecido adiposo quando comparados aos camundongos selvagens, neste caso, pressupomos que pela falta da IL-4 haveria um aumento de linfócitos citotóxicos e de macrófagos classicamente ativados, já que esta interleucina é relevante para a homeostase do tecido adiposo branco, como visto por Brestoff et al., 2015. Na figura da direita: camundongos selvagens e IL-4KO mantidas em HFD e tratados com melatonina, observamos que para a melatonina ter seu efeito protetor contra o ganho de peso corporal é necessário a presença da IL-4.

## 6. CONCLUSÃO

A citocina IL-4 participa do controle de peso de camundongos após a ingestão de dieta rica em lipídeo por 7 dias. Tanto o ganho de peso corporal como o peso do tecido adiposo epididimário apresentaram aumento significativamente maior em animais nocauteados para IL-4 quando comparados com selvagens. Também foi detectada hipertrofia dos adipócitos brancos e uma maior proporção de células imunocompetentes, como linfócitos citotóxicos e de macrófagos. O principal achado deste trabalho é que o efeito da melatonina, como regulador da inflamação no ganho de peso é mediado por IL-4, indicando que melatonina e IL-4 formam parte de uma mesma cascata de controle do tecido adiposo epididimário e ganho de peso.

## 7. RESUMO

A inflamação do tecido adiposo branco envolve respostas imunológicas e neurais com mudança do padrão metabólico, hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, além de invasão de neutrófilos e macrófagos de origem monocítica. Excesso de triglicérides desencadeia resposta inflamatória de forma semelhante a padrões moleculares associados a patógenos, perigo ou dano. Alimentação rica em lipídeos (HFD) por uma noite leva à ativação do eixo imune-pineal inibindo a produção de melatonina pela pineal e promovendo a síntese de melatonina por macrófagos periféricos. No tecido adiposo branco a IL-4, uma citocina produzida por eosinófilos e linfócitos, participa da ativação do metabolismo energético e controlando o aumento do tecido adiposo branco. O entendimento dos mecanismos de ação envolvidos na resposta inflamatória do tecido adiposo é relevante para criar formulações confiáveis antiobesogênicas. Deste modo, esse trabalho foi realizado com o objetivo de entendermos se os efeitos antiinflamatórios da melatonina no tecido adiposo são mediados pela IL-4. Camundongos nocauteados para o gene que expressa IL-4 mantidos em HFD por sete dias, apresentaram um maior ganho de peso corporal e de tecido adiposo em um período em que obesidade ainda não está instalada. Foi verificado que a HFD promove alterações citológicas no tecido adiposo epididimal de camundongos selvagens. Observamos também, que é necessária a presença da IL-4 para que a melatonina possa atuar contra o ganho de peso causado pela HFD. Apesar de não ter havido uma confirmação destes efeitos no aumento do tecido adiposo epididimal, os dados sugerem fortemente que a melatonina atua via IL-4 protegendo contra o ganho de peso corporal.

## 8. ABSTRACT

Inflammation of white adipose tissue involves immune and neural responses with changes in the metabolic pattern, hypertrophy and hyperplasia of adipocytes, in addition to the invasion of neutrophils and macrophages of monocytic origin. Excess triglycerides trigger an inflammatory response similar to molecular patterns associated with pathogens, danger, or harm. High-fat diet (HFD) for one night leads to activation of the pineal-immune axis, inhibiting melatonin production by the pineal and promoting melatonin synthesis by peripheral macrophages. In white adipose tissue, IL-4, a cytokine produced by eosinophils and lymphocytes, participates in activating energy metabolism and controlling the increase in white adipose tissue. Understanding the mechanisms of action involved in the inflammatory response of adipose tissue is relevant to create reliable anti-obesogenic formulations. Thus, this work was carried out with the aim of understanding whether the anti-inflammatory effects of melatonin on adipose tissue are mediated by IL-4. Mice knocked out for the gene that expresses IL-4, maintained on HFD for seven days, showed greater gain in body weight and adipose tissue in a period when obesity is not yet installed. It was found that HFD promotes cytological changes in the epididymal adipose tissue of wild-type mice. We also observed that the presence of IL-4 is necessary for melatonin to act against the weight gain caused by HFD. Although there has not been a confirmation of these effects in the increase of epididymal adipose tissue, the data strongly suggest that melatonin acts via IL-4 protecting against body weight gain.

## 9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew J; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 536 p.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, Darío; ESCAMES, Germaine; VENEGAS, Carmen; DÍAZ-CASADO, María E.; LIMA-CABELLO, Elena; LÓPEZ, Luis C.; ROSALES-CORRAL, Sergio; TAN, Dun- Xian; REITER, Russel J.. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 20 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-014-1579-2>. Acesso em 16 mar. 2020.
- ALLISON, Margaret B; MYERS, Martin G. 20 YEARS OF LEPTIN: connecting leptin signaling to biological function. **Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 223, n. 1, p. 25-35, out. 2014. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/joe-14-0404>. Disponível em: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/223/1/T25.xml>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- ANTUNES, L. C.; LEVANDOVSKI, R.; DANTAS, G.; CAUMO, W.; HIDALGO, M. P.. Obesity and shift work: chronobiological aspects. **Nutrition Research Reviews**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 155-168, 2 fev. 2010. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0954422410000016>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/nutrition-research-reviews/article/obesity-and-shift-work-chronobiological-aspects/7B5A6E19EFCAE4AB025A9EECF9FF9F6>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- ARNER, Peter; BERNARD, Samuel; SALEHPOUR, Mehran; POSSNERT, Göran; LIEBL, Jakob; STEIER, Peter; BUCHHOLZ, Bruce A.; ERIKSSON, Mats; ARNER, Erik; HAUNER, Hans; SPALDING, Kirsty. Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. **Nature**, [S.L.], v. 478, n. 7367, p. 110-113, 25 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10426>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature10426>. Acesso em 10 fev. 2023.
- BARBATELLI, G.; MURANO, I.; MADSEN, L.; HAO, Q.; JIMENEZ, M.; KRISTIANSEN, K.; GIACOBINO, J. P.; MATTEIS, R. de; CINTI, S.. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is

determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 298, n. 6, p. 1244-1253, jun. 2010. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00600.2009>. Acesso em: 10 fev. 2023.

BILAL, Muhammad; NAWAZ, Allah; KADO, Tomonobu; ASLAM, Muhammad Rahil; IGARASHI, Yoshiko; NISHIMURA, Ayumi; WATANABE, Yoshiyuki; KUWANO, Takahide; LIU, Jianhui; MIWA, Hiroyuki. Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. **Molecular Metabolism**, [S.L.], v. 54, p. 101328, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101328>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212877821001757?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jun. 2022.

BJORNTORP, P.. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? **Obesity Reviews**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 73-86, maio 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1467-789x.2001.00027.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1467-789x.2001.00027.x>. Acesso em: 13 jun. 2022.

BORGES-SILVA, Cristina N.; FONSECA-ALANIZ, Miriam H.; ALONSO-VALE, Maria I. C.; TAKADA, Julie; ANDREOTTI, Sandra; PERES, Sidney B.; CIPOLLA-NETO, José; PITHON-CURI, Tânia C.; LIMA, Fabio B.. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 178-184, 23 maio 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079x.2005.00241.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-079X.2005.00241.x>. Acesso em: 20 nov. 2022.

BRESTOFF, Jonathan R.; ARTIS, David. Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease. **Cell**, [S.L.], v. 161, n. 1, p. 146-160, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.022>. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(15\)00188-](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(15)00188-)

9?\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867415001889%3Fshowall%3Dtrue. Acesso em: 20 nov. 2022.

CANNON, Barbara; NEDERGAARD, Jan. Brown Adipose Tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 84, n. 1, p. 277-359, jan. 2004. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00015.2003>. Acesso em: 08 abr. 2019.

CASTRO, A.M.; LACONCHA, L.e. Macedo-De; PANTOJA-MELÉNDEZ, C.A.. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Revista Médica del Hospital General de México**, [S.L.], v. 80, n. 2, p. 101-105, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.06.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0185106316300737?via%3Dihub>. Acesso em: 08 abr. 2019.

CECON, Erika; OISHI, Atsuro; JOCKERS, Ralf. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 175, n. 16, p. 3263-3280, 17 ago. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13950>. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13950>. Acesso em 08 abr. 2019.

CHAWLA, Ajay; NGUYEN, Khoa D.; GOH, Y. P. Sharon. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 738-749, 10 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3071>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3071>. Acesso em 08 abr. 2019.

CHOE, Sung Sik; HUH, Jin Young; HWANG, In Jae; KIM, Jong In; KIM, Jae Bum. Adipose Tissue Remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 7, p. 1-12, 13 abr. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2016.00030/full>. Acesso em 08 abr. 2019.

- CINTI, S.. The adipose organ. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 9-15, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2005.04.010>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327805000542>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; AFECHE, S. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J.. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 371-381, 5 abr. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12137>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.12137>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- CNOP, Miriam; FOUFELLE, Fabienne; VELLOSO, Licio A.. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 59-68, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.010>. Disponível em: <https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914>. Acesso em 08 abr. 2019.
- COELHO, Marisa; OLIVEIRA, Teresa; FERNANDES, Ruben. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives Of Medical Science**, [S.L.], v. 2, p. 191-200, 2013. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>. Disponível em: <https://www.archivesofmedicalscience.com/State-of-the-art-paper-Biochemistry-of-adipose-tissue-an-endocrine-organ,53091,0,2.html>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- CREWE, Clair; AN, Yu Aaron; SCHERER, Philipp E.. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 127, n. 1, p. 74-82, 3 jan. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci88883>. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/88883>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira; CARVALHO-SOUSA, Claudia Emanuele; TAMURA, Eduardo Koji; PINATO, Luciana; CECON, Erika; FERNANDES, Pedro Augusto Carlos Magno; AVELLAR, Maria Christina Werneck de; FERREIRA, Zulma Silva; MARKUS, Regina Pekelmann. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], p. 1-15, 25 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079x.2010.00785.x>.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-079X.2010.00785.x>. Acesso em 08 abr. 2019.

CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira; et al. Short-term high-fat diet feeding (HFD) induces inflammation and decreases nocturnal synthesis of melatonin. In: Anais do Symposium peripheral and central regulation of energy and fluid tonicity homeostasis, Ribeirão Preto, Brasil. (2017). (Poster e Comunicação Oral). Disponível em: <https://symposium-homeostasis.fmrp.usp.br/wp-content/uploads/sites/301/2017/09/programandabstracts04OUT.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2019.

CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira; PINATO, Luciana; TAMURA, Eduardo Koji; CARVALHO-SOUSA, Cláudia Emanuele; MARKUS, Regina P.. Glia-Pinealocyte Network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (tnf). **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 1-16, 2 jul. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040142>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040142>. Acesso em 08 abr. 2019.

CZECH, Michael P. Macrophages dispose of catecholamines in adipose tissue. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 23, n. 11, p. 1255-1257, nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4440>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.4440>. Acesso em 08 abr. 2019.

DE SOUZA, Caroline A. P.; GALLO, Camila Congentino; CAMARGO, Ludmilla Scodeler; CARVALHO, Paula Vargas Versignassi; OLESÇUCK, Ingrid Fernandes; MACEDO, Felipe; CUNHA, Fernanda Marques da; CIPOLLA-NETO, José; AMARAL, Fernanda G. do. Melatonin multiple effects on brown adipose tissue molecular machinery. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 1-16, 31 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12549>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.12549>. Acesso em: 14 jun. 2021.

DIGIROLAMO, M.; FINE, J. B.; TAGRA, K.; ROSSMANITH, R.. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [S.L.], v. 274, n. 5, p. 1466-1467, 1 maio 1998. American Physiological Society.

<http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.5.r1460>. Disponível em:  
<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.1998.274.5.R1460>. Acesso em: 13 jun. 2020.

FARIAS, Talita; PAIXAO, Regislane; CRUZ, Maysa; SA, Roberta de; SIMÃO, Jussara; ANTRACO, Vitor; ALONSO-VALE, Maria. Melatonin Supplementation Attenuates the Pro-Inflammatory Adipokines Expression in Visceral Fat from Obese Mice Induced by A High-Fat Diet. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1041-1051, 6 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8091041>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/1041>. Acesso em 10 jun. 2021.

FERNANDES, P. A. C. M.; BOTHOREL, B.; CLESSE, D.; MONTEIRO, A. W. A.; CALGARI, C.; RAISON, S.; SIMONNEAUX, V.; MARKUS, R. P.. Local Corticosterone Infusion Enhances Nocturnal Pineal Melatonin Production In Vivo. **Journal Of Neuroendocrinology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 90-97, fev. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01817.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2826.2008.01817.x>. Acesso em: 10 jun. 2021.

FERREIRA, Zulma S.; FERNANDES, Pedro A. C. M.; DUMA, Danielle; ASSREUY, Jamil; AVELLAR, Maria C. W.; MARKUS, Regina P.. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 182-188, abr. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079x.2004.00191.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-079X.2004.00191.x>. Acesso em 10 jun. 2021.

FOLL, Christelle Le; LEVIN, Barry E.. Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [S.L.], v. 310, n. 11, p. 1186-1192, 1 jun. 2016. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2016>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27122369/>. Acesso em: 20 ago. 2021.

FONSECA-ALANIZ, Miriam H.; TAKADA, Julie; ALONSO-VALE, Maria Isabel C.; LIMA, Fabio Bessa. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v.

50, n. 2, p. 216-229, abr. 2006. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302006000200008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/htcRSX7FjpchRd4gHNkg7VR/?lang=pt>. Acesso em: 20 ago. 2021.

FOULKES, Nicholas S.; ASSONE-CORSI, Paolo; BORJIGIN, Jimo; SNYDER, Solomon H.; SNYDER, Solomon H.. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 20, n. 10, p. 487-492, out. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01109-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01109-0). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223697011090>. Acesso em 20 ago. 2021.

FRIEDMAN, Jeffrey M.. Leptin and the endocrine control of energy balance. **Nature Metabolism**, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 754-764, 12 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42255-019-0095-y>. Acesso em 20 ago. 2021.

GBAHOU, Florence; CECON, Erika; VIAULT, Guillaume; GERBIER, Romain; JEAN-ALPHONSE, Frederic; KARAMITRI, Angeliki; GUILLAUMET, Gérald; DELAGRANGE, Philippe; FRIEDLANDER, Robert M; VILARDAGA, Jean-Pierre; JOCKERS, Ralf. Design and validation of the first cell-impermeant melatonin receptor agonist. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 174, n. 14, p. 2409-2421, 11 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13856>. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13856>. Acesso em 27 jul. 2022.

GILLETTE M.; TISCHKAU S. Suprachiasmatic Nucleus: The Brain's Circadian Clock . **Recent Prog Horm Res.** 54: 33–58, 1999.

GOOLEY, Joshua J.; LU, Jun; CHOU, Thomas C.; SCAMMELL, Thomas E.; SAPER, Clifford B.. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 1165-1165, 19 nov. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn768>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn768>. Acesso em 29 mai. 2020.

GOOSSENS, Gijis H.. The Metabolic Phenotype in Obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function. **Obesity Facts**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 207-

215, 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000471488>. Disponível em: <https://karger.com/ofa/article/10/3/207/239503/The-Metabolic-Phenotype-in-Obesity-Fat-Mass-Body>. Acesso em 29 mai. 2020.

HALPERN, Bruno; MANCINI, Marcio C.; BUENO, Clarissa; BARCELOS, Isabella P.; MELO, Maria Edna de; LIMA, Marcos S.; CARNEIRO, Camila G.; SAPIENZA, Marcelo T.; BUCHPIGUEL, Carlos Alberto; AMARAL, Fernanda Gaspar do. Melatonin Increases Brown Adipose Tissue Volume and Activity in Patients With Melatonin Deficiency: a proof-of-concept study. **Diabetes**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 947-952, 14 fev. 2019. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db18-0956>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30765337/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

HALPERN, Bruno; MANCINI, Marcio C.; BUENO, Clarissa; BARCELOS, Isabella P.; MELO, Maria Edna de; LIMA, Marcos S.; CARNEIRO, Camila G.; SAPIENZA, Marcelo T.; BUCHPIGUEL, Carlos Alberto; AMARAL, Fernanda Gaspar do; CIPOLLA-NETO, José. Melatonin Increases Brown Adipose Tissue Volume and Activity in Patients With Melatonin Deficiency: a proof-of-concept study. **Diabetes**, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 947-952, 14 fev. 2019. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db18-0956>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/68/5/947/39739/Melatonin-Increases-Brown-Adipose-Tissue-Volume>. Acesso em: 25 abr. 2020.

HAN, Tim Tian Y.; TOUTOUNJI, Sandra; AMSDEN, Brian G.; FLYNN, Lauren E.. Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. **Biomaterials**, [S.L.], v. 72, p. 125-137, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.053>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961215007358?via%3Dihub>. Acesso em 29 mai. 2021.

HENRY, B. A.; CLARKE, I. J.. Adipose Tissue Hormones and the Regulation of Food Intake. **Journal Of Neuroendocrinology**, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 842-849, jun. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.1730.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18601708/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

- IBRAHIM, M. Mohsen. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 11-18, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789x.2009.00623.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19656312/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- ITOH, Michiko; SUGANAMI, Takayoshi; HACHIYA, Rumi; OGAWA, Yoshihiro. Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. **International Journal Of Inflammation**, [S.L.], v. 2011, p. 1-8, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/720926>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21755030/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- IVANOV, Dmitry O.; EVSYUKOVA, Inna I.; MAZZOCOLI, Gianluigi; ANDERSON, George; POLYAKOVA, Victoria O.; KVETNOY, Igor M.; CARBONE, Annalucia; NASYROV, Ruslan A.. The Role of Prenatal Melatonin in the Regulation of Childhood Obesity. **Biology**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 72, 5 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology9040072>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7235795/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- JIMÉNEZ-ARANDA, Aroa; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, Gumersindo; CAMPOS, Daniel; TASSI, Mohamed; VELASCO-PEREZ, Lourdes; TAN, Dun-Xian; REITER, Russel J.; AGIL, Ahmad. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 416-423, 6 set. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12089>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24007241/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- JOCKERS, Ralf; DELAGRANGE, Philippe; DUBOCOVICH, Margarita L.; MARKUS, Regina P.; RENAULT, Nicolas; TOSINI, Gianluca; CECON, Erika; ZLOTOS, Darius P.. Update on melatonin receptors: iuphar review 20. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 173, n. 18, p. 2702-2725, 8 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13536>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27314810/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- KAJIMURA, Shingo; SEALE, Patrick; KUBOTA, Kazuishi; LUNSFORD, Elaine; FRANGIONI, John V.; GYGI, Steven P.; SPIEGELMAN, Bruce M.. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16–C/EBP- $\beta$  transcriptional complex. **Nature**, [S.L.], v. 460, n. 7259, p. 1154-1158, 29 jul. 2009. Springer Science and

Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08262>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19641492/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

KARAMITRI, Angeliki; RENAULT, Nicolas; CLEMENT, Nathalie; GUILLAUME, Jean-Luc; JOCKERS, Ralf. Minireview: toward the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis. **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 1217-1233, ago. 2013. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2013-1101>. Disponível em: <https://academic.oup.com/mend/article/27/8/1217/2615189>. Acesso em: 20 abr. 2021.

KARLSSON, B; KNUTSSON; LINDAHL, B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people. **Occupational And Environmental Medicine**, [S.L.], v. 58, n. 11, p. 747-752, 1 nov. 2001. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.58.11.747>. Disponível em: <https://oem.bmj.com/content/58/11/747>. Acesso em: 29 mai. 2021.

KARLSSON, Berndt; KNUTSSON, Anders; LINDAHL, Bernt. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people. **Occupational And Environmental Medicine**, [S.L.], v. 58, n. 11, p. 747-752, 1 nov. 2001. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.58.11.747>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11600731/>. Acesso em: 08 nov. 2022.

LEBLANC, Erin S.; PATNODE, Carrie D.; WEBBER, Elizabeth M.; REDMOND, Nadia; RUSHKIN, Megan; O'CONNOR, Elizabeth A.. Behavioral and Pharmacotherapy Weight Loss Interventions to Prevent Obesity-Related Morbidity and Mortality in Adults. **Jama**, [S.L.], v. 320, n. 11, p. 1172, 18 set. 2018. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2018.7777>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30326501/>. Acesso em: 08 nov. 2022

LEÓN-PEDROZA, José Israel; GONZÁLEZ-TAPIA, Luis Alonso; OLMO-GIL, Esteban del; CASTELLANOS-RODRÍGUEZ, Diana; ESCOBEDO, Galileo; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Antonio. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. **Cirugía y Cirujanos**, [S.L.], v. 83, n. 6, p. 543-551, nov. 2015.

Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.041>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009741115001188>. Acesso em: 10 maio 2023.

LERNER, Aaron B.; CASE, James D.; TAKAHASHI, Yoshiyata; LEE, Teh H.; MORI, Wataru. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 80, n. 10, p. 2587-2587, maio 1958. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01543a060>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja01543a060>. Acesso em: 20 ago. 2021.

LIANG, Weizheng; QI, Yanxu; YI, Hongyang; MAO, Chenyu; MENG, Qingxue; WANG, Hao; ZHENG, Chunfu. The Roles of Adipose Tissue Macrophages in Human Disease. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 9 jun. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.908749>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.908749/full>. Acesso em: 16 abr. 2023.

LIMA, Leila Eliza Barbosa; MUXEL, Sandra Marcia; KINKER, Gabriela S.; CARVALHO-SOUSA, Cláudia Emanuele; CRUZ-MACHADO, Sanseray Silveira; MARKUS, Regina P.; FERNANDES, Pedro Augusto Carlos Magno. STAT1-NFκB crosstalk triggered by interferon gamma regulates noradrenaline-induced pineal hormonal production. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 67, n. 3, p. 1-12, set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12599>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.12599>. Acesso em: 29 mai. 2022.

LIN, Shih-Yi; YANG, Ching-Ping; WANG, Ya-Yu; HSIAO, Chiao-Wan; CHEN, Wen-Ying; LIAO, Su-Lan; LO, Yu-Li; CHANG, Yih-Hsin; HONG, Chen-Jee; CHEN, Chun-Jung. Interleukin-4 Improves Metabolic Abnormalities in Leptin-Deficient and High-Fat Diet Mice. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 4451, 23 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21124451>. Disponível em: <https://scholar.nycu.edu.tw/en/publications/interleukin-4-improves-metabolic-abnormalities-in-leptin-deficien>. Acesso em: 23 jul. 2021

LIU, Zhenjiang; GAN, Lu; ZHANG, Tiantian; REN, Qian; SUN, Chao. Melatonin alleviates adipose inflammation through elevating  $\alpha$ -ketoglutarate and diverting

- adipose-derived exosomes to macrophages in mice. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 1-47, 4 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12455>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29149454/>. Acesso em: 08 ago. 2022.
- LOPES, C.; MARIANO, Mário; MARKUS, Regina P.. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 6-11, 1 fev. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s000110050717>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11235023/>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- LU, Jingli; ZHAO, Junjie; MENG, Haiyang; ZHANG, Xiaojian. Adipose Tissue-Resident Immune Cells in Obesity and Type 2 Diabetes. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-12, 22 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01173>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6540829/pdf/fimmu-10-01173.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2023
- MACOTELO, Yazmín; EMANUELLI, Brice; MORI, Marcelo A.; GESTA, Stephane; SCHULZ, Tim J.; TSENG, Yu-Hua; KAHN, C. Ronald. Intrinsic Differences in Adipocyte Precursor Cells From Different White Fat Depots. **Diabetes**, [S.L.], v. 61, n. 7, p. 1691-1699, 15 jun. 2012. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db11-1753>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22596050/>. Acesso em: 07 fev. 2019.
- MAESTRONI GJ, CONTI A, LISSONI P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res.* 1; 54(17): 4740-3. 1 set. 1992.
- MANCHESTER, Lucien C.; COTO-MONTES, Ana; BOGA, Jose Antonio; ANDERSEN, Lars Peter H.; ZHOU, Zhou; GALANO, Annia; VRIEND, Jerry; TAN, Dun-Xian; REITER, Russel J.. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 403-419, 11 set. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12267>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26272235/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

- MARGULIS, Lynn. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles: criteria for proof. **Symposia Of The Society For Experimental Biology**, [S.I.], v. 29, n. 1, p. 21-38, maio 1975. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/822529/>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- MARKUS, R. P. Nível de melatonina pode indicar grau de malignidade de tumores. Agência FAPESP. São Paulo, p. 1-6. jun. 2018. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/nivel-de-melatonina-pode-indicar-grau-de-malignidade-de-tumores/28115>. Acesso em: 28 ago. 2023.
- MARKUS, Regina P.; FERREIRA, Zulma S.; FERNANDES, Pedro A.C.M.; CECON, Erika. The Immune-Pineal Axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, [S.L.], v. 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000110635>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18073503/>. Acesso em: 04 abr. 2019.
- MARKUS, Regina P.; SOUSA, Kassiano S.; CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira; FERNANDES, Pedro A.; FERREIRA, Zulma S.. Possible Role of Pineal and Extra-Pineal Melatonin in Surveillance, Immunity, and First-Line Defense. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 22, p. 12143-12147, 10 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212143>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34830026/>. Acesso em: 17 nov. 2022.
- MARKUS, Regina P; A FERNANDES, Pedro; KINKER, Gabriela s; CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira; MARÇOLA, Marina. Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 175, n. 16, p. 3239-3250, 15 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14083>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29105727/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- MARKUS, Regina; CECON, Erika; PIRES-LAPA, Marco. Immune-Pineal Axis: nuclear factor kb (nf-kb) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 10979-10997, 24 maio 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140610979>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23708099/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

- MARTINEZ-SANTIBAÑEZ, Gabriel; LUMENG, Carey Nien-Kai. Macrophages and the Regulation of Adipose Tissue Remodeling. **Annual Review Of Nutrition**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 57-76, 17 jul. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161113>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24850386/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- MCLAUGHLIN, Tracey; LAMENDOLA, Cindy; LIU, Alice; ABBASI, Fahim. Preferential Fat Deposition in Subcutaneous Versus Visceral Depots Is Associated with Insulin Sensitivity. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 96, n. 11, p. 1756-1760, 1 nov. 2011. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2011-0615>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21865361/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- MIRICK, Dana K.; BHATTI, Parveen; CHEN, Chu; NORDT, Frank; STANCZYK, Frank Z.; DAVIS, Scott. Night Shift Work and Levels of 6-Sulfatoxymelatonin and Cortisol in Men. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 1079-1087, 1 jun. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-12-1377>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563887/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- MISRA, Anoop; VIKRAM, Naval K. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. **Nutrition**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 457-466, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)01003-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(02)01003-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12714101/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- MOORE, Robert Y.; SPEH, Joan C.; CARD, J. Patrick. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. **The Journal Of Comparative Neurology**, [S.L.], v. 352, n. 3, p. 351-366, 13 fev. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903520304>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7706557/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- MUXEL, Sandra Marcia; ROSÁRIO, Ana Paula Freitas do; SARDINHA, Luiz Roberto; CASTILLO-MÉNDEZ, Sheyla Inés; ZAGO, Cláudia Augusta; RODRIGUEZ-MÁLAGA, Sérgio Marcelo; MOSIG, José Maria Álvarez; LIMA, Maria Regina D'Império. Comparative Analysis of Activation Phenotype, Proliferation, and IFN- $\gamma$  Production by Spleen NK1.1+and NK1.1-T Cells

- During *Plasmodium chabaudi* AS Malaria. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 417-426, jun. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2009.0095>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2893693/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- NDUHIRABANDI, Frederic; HUISAMEN, Barbara; STRIJDOM, Hans; BLACKHURST, Dee; LOCHNER, Amanda. Short-term melatonin consumption protects the heart of obese rats independent of body weight change and visceral adiposity. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 57, n. 3, p. 317-332, 20 set. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12171>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25187154/>. Acesso em: 10 mar. 2018.
- NGUYEN, Khoa D.; QIU, Yifu; CUI, Xiaojin; GOH, Y. P. Sharon; MWANGI, Julia; DAVID, Tovo; MUKUNDAN, Lata; BROMBACHER, Frank; LOCKSLEY, Richard M.; CHAWLA, Ajay. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, [S.L.], v. 480, n. 7375, p. 104-108, 20 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10653>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22101429/>. Acesso em: 10 jun. 2019.
- NISHIMURA, Satoshi; MANABE, Ichiro; NAGASAKI, Mika; ETO, Koji; YAMASHITA, Hiroshi; OHSUGI, Mitsuru; OTSU, Makoto; HARA, Kazuo; UEKI, Kohjiro; SUGIURA, Seiryu; YOSHIMURA, Kotaro; KADOWAKI, Takashi; NAGAI, Ryozo. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 914-920, 26 jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1964>. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/19633658>. Acesso em: 10 fev. 2020
- NISHIO, Miwako; SAEKI, Kumiko. The Remaining Mysteries about Brown Adipose Tissues. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 1-15, 10 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9112449>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7696203/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

ORR, Jeb S.; KENNEDY, Arion; ANDERSON-BAUCUM, Emily K.; WEBB, Corey D.; FORDAHL, Steve C.; ERIKSON, Keith M.; ZHANG, Yaofang; ETZERODT, Anders; MOESTRUP, Søren K.; HASTY, Alyssa H.. Obesity Alters Adipose Tissue Macrophage Iron Content and Tissue Iron Distribution. **Diabetes**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 421-432, 16 jan. 2014. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db13-0213>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24130337/>. Acesso em: 01 ago. 2018.

OSTROWSKA, Zofia; KOS-KUDLA, Beata; MAREK, Bogdan; SWIETOCHOWSKA, Elzbieta; GÓRSKI, Janusz. Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. **Neuroendocrinology Letters**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 121-127, fev. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11335888/>. Acesso em: 07 mar. 2020.

OTAMAS, Anastasia; GRANT, Peter J; A AJJAN, Ramzi. Diabetes and atherothrombosis: the circadian rhythm and role of melatonin in vascular protection. **Diabetes And Vascular Disease Research**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 1-13, mar. 2020. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1479164120920582>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7607413/>. Acesso em: 10 maio 2022.

PARK, Hyeong-Kyu; AHIMA, Rexford S.. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 24-34, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25199978/>. Acesso em: 01 set. 2021

PFEIFER, Alexander; HOFFMANN, Linda S.. Brown, Beige, and White: the new color code of fat and its pharmacological implications. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 207-227, 6 jan. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124346>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149919/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

PIAGGI, Paolo; HEARLE, Marie S.; BOGARDUS, Clifton; KRAKOFF, Jonathan. Lower Energy Expenditure Predicts Long-Term Increases in Weight and Fat Mass. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 98, n. 4,

p. 703-707, 1 abr. 2013. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2012-3529>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23418317/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

PIRES-LAPA, Marco; CARVALHO-SOUSA, Claudia; CECON, Erika; FERNANDES, Pedro; MARKUS, Regina.  $\beta$ -Adrenoceptors Trigger Melatonin Synthesis in Phagocytes. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2182, 26 jul. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082182>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121262/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

PONTES, Gerlandia N.; CARDOSO, Elaine C.; CARNEIRO-SAMPAIO, Magda M. S.; MARKUS, Regina P.. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 136-141, set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079x.2006.00345.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16879319/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

PRUNET-MARCASSUS, Bénédicte; DESBAZEILLE, Mathieu; BROS, Arnaud; LOUCHE, Katie; DELAGRANGE, Philippe; RENARD, Pierre; CASTEILLA, Louis; PÉNICAUD, Luc. Melatonin Reduces Body Weight Gain in Sprague Dawley Rats with Diet-Induced Obesity. **Endocrinology**, [S.L.], v. 144, n. 12, p. 5347-5352, dez. 2003. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0693>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12970162/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

RALPH, Martin R.; FOSTER, Russell G.; DAVIS, Fred C.; MENAKER, Michael. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. **Science**, [S.L.], v. 247, n. 4945, p. 975-978, 23 fev. 1990. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.2305266>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2305266/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

RASMUSSEN, Dennis D.; BOLDT, Brian M.; WILKINSON, Charles; YELLON, Steven M.; MATSUMOTO, Alvin M.. Daily Melatonin Administration at Middle Age Suppresses Male Rate Visceral Fat, Plasma Leptin, and Plasma Insulin to Youthful Levels. **Endocrinology**, [S.L.], v. 140, n. 2, p. 1009-1012, 1 fev. 1999.

- The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.140.2.6674>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9927336/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- REITER, Russel J.; ROSALES-CORRAL, Sergio; TAN, Dun Xian; JOU, Mei Jie; GALANO, Annia; XU, Bing. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 74, n. 21, p. 3863-3881, 1 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28864909/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- REITER, Russel J.; TAN, Dun-Xian; KORKMAZ, Ahmet; MA, Shuran. Obesity and metabolic syndrome: association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. **Annals Of Medicine**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 564-577, set. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07853890.2011.586365>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21668294/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- ROWLAND, Neil E.; MORIEN, Annie; LI, Bai-Han. The physiology and brain mechanisms of feeding. **Nutrition**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 626-639, set. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(96\)00227-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(96)00227-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8878173/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SAARELA, Seppo; REITER, Russel J.. Function of melatonin in thermoregulatory processes. **Life Sciences**, [S.L.], v. 54, n. 5, p. 295-311, jan. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00786-1](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(94)00786-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8289591/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SÁRVÁRI, Anitta Kinga; VAN HAUWAERT, Elvira Laila; MARKUSSEN, Lasse Kruse; GAMMELMARK, Ellen; MARCHER, Ann-Britt; EBBESEN, Morten Frenndø; NIELSEN, Ronni; BREWER, Jonathan Richard; MADSEN, Jesper Grud Skat; MANDRUP, Susanne. Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 437-453, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33378646/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

- SCHÄFFLER, Andreas. Rolle der Metaflammation als systemische Manifestation bei Stoffwechselerkrankungen. **Die Innere Medizin**, [S.L.], v. 64, n. 4, p. 313-322, 8 nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00108-022-01416-7>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36346457/>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- SCHIPPER, Henk S.; PRAKKEN, Berent; KALKHOVEN, Eric; BOES, Marianne. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 407-415, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.011>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22795937/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SEGERSTROM, Suzanne C.. Stress, Energy, and Immunity. **Current Directions In Psychological Science**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 326-330, dez. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-8721.2007.00522.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18645630/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SHAJI, Av; KULKARNI, Sk; AGREWALA, Jn. Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. **Clin Exp Immunol**, [s. l.], v. 1, n. 111, p. 181-200, jan. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9472679/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SZEWCZYK-GOLEC, Karolina; RAJEWSKI, Paweł; GACKOWSKI, Marcin; MILAKIERZENKOWSKA, Celestyna; WESOŁOWSKI, Roland; SUTKOWY, Paweł; PAWŁOWSKA, Marta; WOŹNIAK, Alina. Melatonin Supplementation Lowers Oxidative Stress and Regulates Adipokines in Obese Patients on a Calorie-Restricted Diet. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-10, 21 set. 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8494107>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29142618/>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- TAMURA, Eduardo Koji; FERNANDES, Pedro Augusto; MARÇOLA, Marina; CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira; MARKUS, Regina Pekelmann. Long-Lasting Priming of Endothelial Cells by Plasma Melatonin Levels. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 12-23, 12 nov. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013958>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2980478/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

TAN, D.-X.; MANCHESTER, L. C.; FUENTES-BROTO, L.; PAREDES, S. D.; REITER, R. J.. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. **Obesity Reviews**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 167-188, 22 fev. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789x.2010.00756.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20557470/>. Acesso em: 20 nov. 2020.

TAN, Dun-Xian; MANCHESTER, Lucien; ESTEBAN-ZUBERO, Eduardo; ZHOU, Zhou; REITER, Russel. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: synthesis and metabolism. **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 10, p. 18886-18906, 16 out. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201018886>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26501252/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

TSAO, Chang-Hui; SHIAU, Ming-Yuh; CHUANG, Pei-Hua; CHANG, Yih-Hsin; HWANG, Jaulang. Interleukin-4 regulates lipid metabolism by inhibiting adipogenesis and promoting lipolysis. **Journal Of Lipid Research**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 385-397, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m041392>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24347527/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

TÜMENTEMUR, Gamze; ALTUNKAYNAK, Berrin Zuhai; KAPLAN, Süleyman. Is melatonin, leptin or their combination more effective on oxidative stress and folliculogenesis in the obese rats? **Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 116-127, 18 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01443615.2019.1657816>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31625776/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

VÁZQUEZ, Gumersindo Fernández; REITER, Russel J.; AGIL, Ahmad. Melatonin increases brown adipose tissue mass and function in Zucker diabetic fatty rats: implications for obesity control. **Journal Of Pineal Research**, [S.L.], v. 64, n. 4, p. 12-44, 25 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12472>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.12472>. Acesso em 29 mai. 2021.

- WADE, G. N.; BARTNESS, T. J.. Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight, and body composition in Siberian hamsters. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [S.L.], v. 246, n. 1, p. 26-30, 1 jan. 1984. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.1984.246.1.r26>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6696099/>. Acesso em: 20 nov. 2022
- WANG, Qiong; TAO, Caroline; GUPTA, Rana K; SCHERER, Philipp e. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 1338-1344, 1 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3324>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23995282/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- WILLIAMS, Lynda M.. Hypothalamic dysfunction in obesity. **Proceedings Of The Nutrition Society**, [S.L.], v. 71, n. 4, p. 521-533, 6 set. 2012. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s002966511200078x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22954151/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- WOLDEN-HANSON, T.; MITTON, D. R.; MCCANTS, R. L.; YELLON, S. M.; WILKINSON, C. W.; MATSUMOTO, A. M.; RASMUSSEN, D. D. Daily Melatonin Administration to Middle-Aged Male Rats Suppresses Body Weight, Intraabdominal Adiposity, and Plasma Leptin and Insulin Independent of Food Intake and Total Body Fat<sup>1</sup>. **Endocrinology**, [S.L.], v. 141, n. 2, p. 487-497, 1 fev. 2000. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.141.2.7311>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10650927/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- XIE, Manyun; HU, Andina; LUO, Yan; SUN, Wei; HU, Xinqian; TANG, Shibo. Interleukin-4 and melatonin ameliorate high glucose and interleukin-1 $\beta$  stimulated inflammatory reaction in human retinal endothelial cells and retinal pigment epithelial cells. **Molecular Vision**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 921-928, jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4077596/pdf/mv-v20-921.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2022
- YANG, Wucai; TANG, Keqiong; WANG, Yaning; ZHANG, Yingying; ZAN, Linsen. Melatonin promotes triacylglycerol accumulation via MT2 receptor during

differentiation in bovine intramuscular preadipocytes. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-12, 8 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12780-y>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29118419/>. Acesso em: 08 jul. 2021.

ZHAO, Dake; YU, Yang; SHEN, Yong; LIU, Qin; ZHAO, Zhiwei; SHARMA, Ramaswamy; REITER, Russel J.. Melatonin Synthesis and Function: evolutionary history in animals and plants. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 10, p. 1-16, 17 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2019.00249>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00249/full>. Acesso em: 20 nov. 2022.

ZHENG, Chunxing; YANG, Qian; XU, Chunliang; SHOU, Peishun; CAO, Jianchang; JIANG, Menghui; CHEN, Qing; CAO, Gang; HAN, Yanyan; LI, Fengying; CAO, Wei; ZHANG, Liying; ZHANG, Li; SHI, Yufang; WANG, Ying. CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 52, p. 1-10, 15 dez. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1500396113>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26669445/>. Acesso em: 10 jun. 2019.